

## Beschreibung

### Diagnostische Marker für Krebs

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung verschiedener Proteine als diagnostische Marker für Krebs, die Verwendung von Wirkstoffen zur Behandlung von Krebs sowie diesbezügliche pharmazeutische Zusammensetzungen und Kits.

10

Krebserkrankungen sind im allgemeinen durch die Entstehung von einem oder mehreren Tumoren gekennzeichnet. Unter Tumor wird eine Geschwulst bzw. die örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens verstanden. Im weiteren Sinne kann jede lokalisierte Anschwellung, z. B. durch ein Ödem, einer akuten und chronischen Entzündung, aneurysmatische Erweiterung, einer entzündlich bedingten Organschwellung (z. B. als sogenannter Milztumor) verstanden werden. Im engeren Sinne werden unter Tumor gewebliche Neubildungen (Gewächs, Plastom, Neoplasie) in Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich aus-

20

geprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktion verbunden ist, verstanden.

Die Tumore werden zur besseren Klassifikation unterteilt in:

5

I. nach ihrem biologischen Verhalten:

10

1. benigne (gutartige) Tumore mit differenzierten Zellen und langsamen, lokal verdrängendem Wachstum.
2. maligne (bösartige) Tumore mit Zellkernpolymorphie, Zellatypie, Anaplasie und infiltrierendem, meist raschem, destruierendem Wachstum und Metastasierung.
3. semimaligne Tumore mit den histologischen Kennzeichen maligner Tumore und lokal infiltrierendem Wachstum, jedoch in der Regel ohne eine Metastasierung.

15

II. histogenetische Systematik:

20

Hierbei werden die Tumore klassifiziert anhand des Gewebes, aus dem sie entwicklungsgeschichtlich hervorgegangen sind. Es gibt:

25

1. epitheliale Tumore, die aus Ektoderm und Entoderm hervorgegangen sind:
  - a) benigne Tumore wie z. B. Adenom, Papillom und Polypen.
  - b) maligne Tumore wie z. B. Karzinom.
2. mesenchymale Tumore, hervorgegangen aus dem Mesoderm:
  - a) benigne Tumore wie z. B. Lipom, Fibrom, Osteom, Myom, Leiomyom, Rhabdomyom, Chondrom,
  - b) maligne Tumore wie z. B. die Sarkome.

30

3. embryonale Tumore sind aus undifferenziertem Gewebe hervorgegangen. Hierzu zählen z. B. Nephroblastome, Neuroblastome, Medulloblastome, Retinoblastome sowie embryonale Rhabdomyosarkome und Teratome.

III. Klassifikation nach klinischen und pathologischen Befunden:

Unter anderem gelten hier die TNM-Klassifikation, Grading, Laurén-Klassifikation, Dukes-Klassifikation, Kieler-Klassifikation, Rappaport-Klassifikation etc.

Schon diese kurze Übersicht der Tumoreinteilung zeigt, welche Vielfalt (und zum Teil Gegensätzlichkeit) innerhalb der verschiedenen Tumorarten besteht. So ist z. B. nicht nur zwischen benignen und malignen Tumoren zu unterscheiden, sondern auch zwischen Mortalität bzw. Letalität der einzelnen Tumore und die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein benigner Tumor zu einem malignen Tumor weiterentwickelt.

Einzelne Tumore wie z. B. die Mamakarzinome (Brustkrebs), der häufigste maligne Tumor der Frau, treten gehäuft vor allem zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr auf. Frühsymptome sind verdächtige Tastbefunde, die in der Regel infolge der Krebsfrüherkennungsuntersuchungen sowie bei regelmäßiger Selbstuntersuchung der Brust entdeckt werden. Abhängig von Tumorstadium und Differenzierungsgrad des Tumors kann dabei die Prognose von durchaus positiv bis sehr schlecht ausfallen. Infolge der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung bei Mamakarzinomen kommt es auf eine rasche Diagnostizierung des Tumors an, um frühestmöglich mit der Therapie einsetzen zu können.

Prostatakarzinome (Karzinom der Prostata) ist demgegenüber der häufigste maligne Tumor des Mannes, der vor allem zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auftritt. In der Mehrzahl handelt es sich dabei um Adeno-

karzinome. Dieser maligne Tumor breitet sich durch infiltrierendes Wachstum zunächst innerhalb der Prostata aus, später erfolgt eine Infiltration von Bläschendrüsen und Beckenbindegewebe, relativ selten auch von Rektum, Harnblase oder Urethra. Die Metastasierung erfolgt  
5 lymphogen und/oder hämatogen. Die Therapie erfolgt abhängig vom histologischen Differenzierungsgrad und klinischen Stadium in der Regel durch radikale Prostatektomie mit regionaler Lymphknotenausräumung, im fortgeschrittenen Stadium Entzug der männlichen Sexualhormone. Auch hierbei ist die Prognose abhängig vom Stadium des Karzinoms.  
10 Während in einem sehr frühen Stadium nach einer radikalen Prostatektomie in ca. 90 % der Fälle eine Heilung eintritt, ist bei fortgeschrittenem Stadium eher mit einer pessimistischen Prognose zu rechnen.

Prostatakarzinome sind von Prostatahyperplasie in der Diagnose zu unterscheiden. Bei der Prostatahyperplasie handelt es sich um einen benignen, also gutartigen Tumor. Dabei vergrößert sich die Prostata durch numerische Zunahme der Zellen und Drüsen des Stromas. Die Prostatahyperplasie ist die häufigste Ursache von Blasenentleerungsstörungen bei Männern. Klinisch beginnt sie vor allem zwischen dem 40. und 50.  
15 Lebensjahr. Der Verlauf ist langsam und schubweise. Das Auftreten von Beschwerden erfolgt dabei meistens erst nach Jahren mit allmählicher Abschwächung des Harnstrahls und verzögertem Miktionsbeginn. Hierbei kann als Therapie bzw. Linderung der Symptomatik die Verabreichung von Phytotherapeutika in Betracht gezogen werden.  
20

25 Da generell eine frühe Erkennung, d. h. Diagnostizierung, der Tumore für den raschen Therapiebeginn wichtig ist und auch die Prognose um so besser ist, je früher der Tumor erkannt wird, sind eine Reihe von sogenannten Tumormarkern im klinischen Einsatz. Als Tumormarker werden dabei allgemein Substanzen und zelluläre Veränderungen bezeichnet, deren qualitative oder quantitative Analyse eine Aussage über Vor-  
30

liegen, Verlauf oder Prognose von (bösartigen) Erkrankungen ermöglichen kann. Eingeteilt werden Tumormarker in:

1. Zelluläre Tumormarker:

5            Darunter fallen unter anderem zellmembranständige Tumorantigene, Rezeptoren (z. B. Hormonrezeptoren, Rezeptoren für wachstumsfördernde Substanzen bei Leukämie) und Zellmarker, die auf eine vermehrte Expression von Onkogenen und ein monoklonales Zellwachstum hindeuten, sowie molekulargenetische zelluläre Veränderungen, vor allem Chromosomenaberrationen.

10

2. Humorale Tumormarker:

15            Diese sind gegenüber physiologischen Bedingungen in Körperproben, insbesondere in Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten in erhöhten Konzentrationen nachweisbare (meist physiologisch vorkommende) Substanzen, die vom Tumorgewebe synthetisiert und/oder sezerniert, durch Tumorerfall freigesetzt oder als Reaktion des Organismus auf einen Tumor gebildet werden. Die physiologische Bedeutung von Tumormarkern ist nur unzureichend bekannt. Im menschlichen Organismus wirken sie in der Regel nicht immunogen. Die klinische (diagnostische) Bedeutung ist abhängig von ihrer Spezifität und Sensitivität. Die humoralen Tumormarker werden in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe werden die humoralen Tumormarker zusammengefaßt, die vom Tumor selbst produziert werden. Darunter fallen z. B. tumorassoziierte Antigene, bestimmte Hormone (z. B. Gastrin, Cortisol etc.), Enzyme (z. B. neuron-spezifische Enolase (NSE)), sowie Proteine (z. B. Bence-Jones-Protein). In der zweiten Gruppe sind die Tumormarker enthalten, die vom Tumor zwar induziert, aber nicht

20

25

30

selbst produziert werden. Wichtige humorale Tumormarker dieser Gruppe sind z. B. alkalische Phosphatase (AP), LDH, Neopterin etc.

- 5 Kürzlich ist eine Liste von Proteinen, die in zwei repräsentativen Zelllinien des Medulloblastoms, des häufigsten Gehirntumors bei Kindern, nachgewiesen werden konnten und möglicherweise als Tumormarker verwendet werden können, veröffentlicht worden [A. Peyrl et al., 2003, Proteomics, 3, 1781-1800]. Aus der US 6,645,465 ist bekannt, dass die
- 10 zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine gehörenden Annexine A1 und A2 als Tumormarker für Lungen-, Brust- und Speiseröhrenkrebs verwendet und durch Detektion von gegen sie gerichtete Auto-Antikörper nachgewiesen werden können. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß der Einsatz von radioaktiv markierten Antikörpern gegen Annexin A1 zu einem
- 15 Verlust an Tumormasse führt, was vermutlich auf den Zelltod der Tumorzellen zurückzuführen ist [P. Oh, Y. Li, J. Yu, E. Durr, K. M. Krassinska, L. A. Carver, J. E. Testa, J. E. Schnitzer, 2004, Nature, 429, 629-35.].

Weiterhin ist neulich eine differentielle Abundanzanalyse in malignen

20 und nicht-malignen (benignen) Pankreasepithelzellen durchgeführt worden, wobei Annexin A3 als identifiziertes Protein in diesem Zusammenhang aufgeführt ist [A. R. Shekouh et al., 2003, Proteomics, 3, 1988-2001]. Ferner ist die Abundanz von Proteinen in malignem und nicht malignem Prostatagewebe untersucht worden. Bezüglich der in diesem Zusammenhang identifizierten Proteine werden allerdings größtenteils keine näheren Angaben zu einer möglichen Über- oder Unterexpression der aufgeführten Proteine im karzinomatösen Gewebe im Vergleich zum

25 gesunden Gewebe gemacht [A. A. Alaiya et al., 2001, Cell. Mol. Life Sci., 58, 307-311].

Die bisher gemachten Aussagen zeigen, wie wichtig selektive und sensitive Nachweisverfahren für Tumore sind. Weiterhin besteht ein großer Bedarf an neuen Targets bei der Tumor- bzw. Krebstherapie.

- 5 Dementsprechend stellt sich die Erfindung die Aufgabe, neue diagnostische Marker für Krebserkrankungen sowie neue Angriffspunkte und Wirkstoffe für die Krebstherapie bereitzustellen.

- 10 Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen genannt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

- 15 Es konnten durch intensive vergleichende Analysen zwischen bösartig entartetem Gewebe (Krebsgewebe) und nicht entartetem Gewebe verschiedene Proteine identifiziert werden, die sich bei diesen Gewebearten in ihrer Häufigkeit bzw. Konzentration (Abundanz) signifikant unterscheiden. Die charakteristische Abundanz eines bestimmten Proteins im Vergleich mit Kontrollen stellt daher ein wichtiges Indiz für das Vorhandensein von entartetem Zellwachstum, also Krebsgewebe, dar. Erfindungsgemäß werden diese Proteine als diagnostische Marker für Krebs  
20 verwendet.

- 25 Zur Identifizierung dieser Proteine wurden Proben aus Krebsgewebe (Prostatakrebs) und gesundem Prostatagewebe aufbereitet und die beiden Proben jeweils mit verschiedenen radioaktiven Isotopen markiert. Die Proben wurden zusammengemischt und gemeinsam auf einem zweidimensionalen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Signale jedes Isotops wurden getrennt detektiert und die entsprechenden Proteinspots weiter analysiert. Mit dieser Vorgehensweise konnten  
30 verschiedene Proteine identifiziert werden, die sich in ihrer Häufigkeit im Krebsgewebe deutlich von der Häufigkeit im gesunden Gewebe unter-

scheiden. Die verschiedenen Proteine sind hierbei zum Teil in Krebsgewebe deutlich häufiger vorhanden bzw. abundant, also heraufreguliert, und zum Teil deutlich weniger vorhanden bzw. abundant, also herabreguliert.

5

Die Erfindung umfaßt die Verwendung des Proteins Annexin A3 als diagnostischen Marker für Prostatakrebs. Die Erfinder konnten zeigen, dass dieses Protein in Krebsgewebe durchschnittlich 2,4-fach, in bestimmten Patientengruppen sogar mehr als 5-fach heraufreguliert ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann Annexin A3 folglich als diagnostischer Marker für bestimmte Unterarten (Patientengruppen) von Prostatakrebs verwendet werden. Daher wird vorzugsweise eine Heraufregulation dieses Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe untersucht. Die Annexine sind eine Familie von strukturell verwandten Proteinen, die Phospholipide in Abhängigkeit von Kalzium binden und Kalziumporen bilden können. Die genaue Rolle der Annexine ist bislang jedoch unklar.

Es wird vermutet, daß die Annexine sowohl an intrazellulären als auch an extrazellulären Vorgängen, beispielsweise Membran-Trafficking, Zellbeweglichkeit,  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und Signaltransduktion, beteiligt sind. Allerdings ist unbekannt, auf welche Weise Annexine sekretiert werden. Beispielsweise besitzen sie keine klassischen Leadersequenzen für eine Translation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Da Annexine jedoch zum Teil in kleinen sekretierten Membran-Vesikeln mit einem Durchmesser von 30-100 nm, den sogenannten Exosomen, gefunden wurden, wird vermutet, daß Annexine durch eine Lyse dieser Exosomen das Äußere der Zelle erreichen können. Die Lyse dieser Vesikel kann zu einer veränderten Antigen-Präsentation in Tumoren führen. Generell spielen Exosomen bei der Antigen-Präsentation im Immunsystem eine Rolle und sind dabei in dem MHC-Klasse I/T-Zell-System involviert.



Interessanterweise sind Annexine in den Vorgang der Knochenmineralisation involviert (Wang, W., Xu, J., Kirsch, T. 2003, Annexin-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. J. Biol. Chem. 2003, 278: 3762-9). Dies ist besonders bemerkenswert, da Prostatakrebsmetastasen im Vergleich mit anderen Krebsarten eine ungewöhnlich hohe Frequenz von osteoblastischen Knochenläsionen verursachen. Die meisten Krebsmetastasen sind durch eine osteolytische Aktivität, d. h. also durch einen Knochenabbau, charakterisiert, Prostatakrebsmetastasen hingegen zeigen sowohl osteoklastische, also abbauende, als auch osteoblastische, also knochenaufbauende, Aktivität. Hierfür werden zunächst normale Knochenkristalle abgebaut und dann als ungeordnete Knochenablagerungen wieder aufgebaut. Obwohl dieser Mechanismus nur wenig verstanden ist, spielen hier vor allem physiologische Mineralisierungsprozesse eine Rolle. Eine Mineralisierung wird durch kleine Vesikel, sogenannte Matrixvesikel, initiiert, welche von den Plasmamembranen mineralisierende Skelettzellen (Osteoblasten) freigesetzt werden. Die erste mineralische Phase (Kalziumphosphatkristalle) formt sich innerhalb der Matrixvesikel. Da diese Vesikel von Membranen umschlossen sind, werden Kanalproteine benötigt, damit die Mineralien in die Vesikel eindringen können. Wichtige Komponenten dieser Vesikel sind die Annexin-Proteine, z.B. Annexin A2, A5 und A6 sowie Collagen-Typ II und X an der äußeren Oberfläche der Vesikel, welche über Bindung an Annexin A5 an die äußere Vesikeloberfläche angelagert werden. Die Annexine bilden Kanäle in den Membranen der Matrixvesikel, durch welche  $\text{Ca}^{2+}$  in die Vesikel eindringt. Collagen, welches an Annexin A5 gebunden ist, verstärkt diese Kanalaktivitäten und vermittelt mit anderen Annexinen den schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und die Bildung der ersten kristallinen Phase innerhalb der Vesikel. Dies führt zur Initiierung der Mineralisation. Wenn die intrazellulären Kristalle eine bestimmte Größe erreicht haben, zerstören sie die Membran und lysieren die Vesikel. Die Kristalle wachsen weiter (Wachstumsphase der Mineralisation) und tragen zum Knochenaufbau bei. Gemäß den Ergebnis-

sen der Erfinder ist diese Rolle der Annexine bei der ungewöhnlichen Knochenmineralisation durch Prostatakrebsmetastasen vermutlich mit der Hochregulation von Annexin A3 in Prostatakrebsgewebe verknüpft. In diesem Zusammenhang ist auch die anorganische Pyrophosphatase zu sehen, die anorganisches Phosphat freisetzt, und welche gemäß den Ergebnissen der Erfinder in Krebs, insbesondere in Prostatakrebs, heraufreguliert wird. Aus der Hochregulation von Annexin A3 in Prostatakrebszellen ist zu schließen, daß Annexin A3 eine biologische Rolle in Exosomen der Prostatakrebszellen spielt. Hierfür kommt vor allem ein Zusammenhang mit Ionenkanälen in Frage. In einer bevorzugten Verwendung des Proteins Annexin A3 wird daher die Aktivität des Proteins in Exosomen beeinflusst. Vorzugsweise führt dies zu einer geänderten Immunüberwachung und metastatischen Eigenschaften der Tumorzellen. Da extrazelluläres Annexin A3 eine höhere Konzentration in der Nähe der Tumorzellen aufweist, kann ein Affinitätsreagens, insbesondere ein therapeutischer Antikörper, welcher eine hohe Affinität zu Annexin A3 besitzt, genutzt werden, um Wirkstoffe wie beispielsweise Toxine oder radioaktive Dosen, in die Nähe des Tumors zu befördern. Solch ein Wirkstoff sollte vorzugsweise nicht die Zellmembran wirksam durchqueren, damit vorteilhafterweise gesunde Zellen, welche lediglich intrazelluläres Annexin A3 exprimieren, hiervon nicht beeinflusst werden. Interessanterweise wurden Matrixvesikel ebenfalls im Zusammenhang mit osteoarthritischem Knorpel und arteriosklerotischen Läsionen beobachtet.

25

Die Freisetzung zytoplasmatischer Proteine in das extrazelluläre Medium, welche nach Lyse der Exosomen erfolgt, kann eine entzündliche Antwort induzieren, die ähnlich der bei einer Zellnekrose ist. Es ist bekannt, daß eine Entzündung die adaptive T-Zellen-vermittelte Immunantwort verringern kann, was bekanntermaßen viele Krebszellen auszeichnet. Ferner kann die Anwesenheit von Annexinen im extrazellulären Raum diesen Verlauf ebenso beeinflussen (A. Bondanza et

30

al., 2004, J. Exp. Med., 200, 1157-65). Deshalb könnte eine Impfung gegen Krebs durch Verstehen und Beeinflussung dieses Systems bestimmt werden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Verwendung des Proteins Annexin A3 wird eine Heraufregulation dieses Proteins in Kombination mit einer Herabregulation von Annexin A1, Annexin A2 und/oder Annexin A5 untersucht. Dies geschieht vorzugsweise im Vergleich mit Kontrollen. Es wurde bereits gezeigt, daß Annexin A1, A2 und Annexin A5 in Krebsgewebe  
10 und insbesondere in Prostatakrebsgewebe herunterreguliert ist. Von daher ist eine Analyse der Heraufregulation von Annexin A3 in Kombination mit der Herunterregulation von einem oder mehreren dieser weiteren Annexine für eine Diagnose besonders aufschlußreich. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse könnte Annexin A3 andere Annexine während  
15 der Prostata-Karzinogenese ersetzen und daher ein Ersatzmarker oder ein Ersatz-Target für die Prostatakrebs-Behandlung sein.

- Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder des Proteins Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)  
20 als diagnostische Marker für Krebs. Hierbei wird vorteilhafterweise eine Herabregulation der Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder eine Heraufregulation der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe herangezogen. Die Erfinder konnten zeigen, daß die Ubiquitin-Isopeptidase T etwa durch-  
25 schnittlich 5 bis 6 x weniger abundant in Krebsgewebe und die PDI etwa doppelt so hoch in Krebsgewebe im Vergleich mit gesundem Gewebe exprimiert wird. Hier zeigt sich eine inverse Korrelation zwischen PDI und Ubiquitin-Isopeptidase T.

- 30 Die Ubiquitin-Isopeptidase T ist ein Enzym, welches neben anderen Enzymen an der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse von Proteinen beteiligt ist. Nach Addition einer Polyubiquitin-Kette an das Zielprotein wird das

ubiquitinierte Protein durch einen Komplex, bestehend aus vielen Unter-  
einheiten, der als 26 S-Proteasom bekannt ist, abgebaut. Die nachfol-  
gende Ablösung der Polyubiquitin-Kette wird durch das zinkbindende  
Enzym Ubiquitin-Isopeptidase T vermittelt. Die Herabregulation von Ubi-  
quitin-Isopeptidase T könnte daher die Geschwindigkeit der Ubiquitin-  
vermittelten Proteolyse in Prostatakrebs oder die Abbaugeschwindigkeit  
spezifischer Proteine beeinflussen. Ebenso wie die Ubiquitin-  
Isopeptidase T ist auch die PDI an der kontrollierten Proteolyse von Pro-  
teinen, also an apoptotischen Prozessen, beteiligt. PDI wechselwirkt im  
endoplasmatischen Retikulum unter bestimmten Bedingungen mit Ubi-  
quilin, welches eine Ubiquitin-artige Domäne und eine Ubiquitin-asso-  
ziierte Domäne aufweist. Diese Assoziation wurde bereits in einen funk-  
tionellen Zusammenhang mit der Erlangung einer Toleranz gegenüber  
ischemischem Streß und Apoptose gestellt (Ko H. S. et al., 2002, J. Biol.  
Chem. 277: 35386-92).

Diese Beziehung hinsichtlich apoptotischen Prozessen zwischen beiden  
Enzymen macht eine Beobachtung der Herab- bzw. Heraufregulation  
beider Proteine als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe beson-  
ders geeignet. Andererseits ist es auch vorteilhaft, wenn nur eines die-  
ser Proteine, insbesondere die Ubiquitin-Isopeptidase T, in der Abun-  
danz als diagnostisches Merkmal analysiert wird. Dies ist besonders vor-  
teilhaft, da die Ubiquitin-Isopeptidase T in ihrer Häufigkeit in Krebsge-  
webe verglichen mit Kontrollen sehr deutlich, d. h. auf etwa ein Fünftel  
bis etwa ein Sechstel, reduziert ist. Die beobachtete reduzierte Abun-  
danz von Ubiquitin-Isopeptidase T in karzinomatösem Gewebe ist stär-  
ker ausgeprägt als bei dem Fettsäure-bindenden Protein der Säugetiere  
(M-FABP), das ein anerkanntes Anti-Onkogen darstellt.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Beeinflussung der T-  
Zellen-Aktivität durch Annexine, durch die MHC(Haupt-  
Histokompatibilitätskomplex)-Antigen-Präsentation via Ubiquitin-

Isopeptidase T und durch eine veränderte Aktivität des systemischen Immunsystems durch die Abwesenheit des Immunoglobulin-Domäne-enthaltenden Proteins SAP in Prostatagewebe könnte für das Überleben der Tumorzellen in Gegenwart des Immunsystems von großer Wichtigkeit sein.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase als diagnostischen Marker für Krebs und/oder als therapeutisches Zielmolekül. Dieses Protein kann auch in Kombination mit dem Fettsäure-bindenden Protein 3 (FABP-3) und/oder dem epidermalen Fettsäure-bindenden Protein (E-FABP) und/oder Annexin A3 verwendet werden. Besonders bevorzugt ist es hierbei, wenn eine Heraufregulation der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FABP) und/oder eine Herabregulation des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) und/oder Annexin A3 im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird, da sich erfindungsgemäß eine solche Herauf- bzw. Herabregulation dieser Proteine als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe herausgestellt hat.

20

Die Erfinder konnten zeigen, daß die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase in Krebsgewebe durchschnittlich etwa 2,8-fach bis 4-fach in ihrer Abundanz erhöht ist. Dieses Enzym wurde bereits im Zusammenhang mit der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beschrieben, welche vorwiegend in den Mitochondrien abläuft. Enoyl-Coenzym A-Hydratase ist an dem nicht oxidativen Metabolismus beteiligt. Es ist seit langem bekannt, daß Krebszellen selbst in Gegenwart eines Sauerstoffüberschusses einen erhöhten nicht oxidativen Metabolismus zeigen und daß sowohl die Fettsäureoxidation als auch die de novo Synthese in Krebspatienten zunimmt. Krebs wird mit einer Vielzahl von Änderungen im Fettsäuremetabolismus in Zusammenhang gebraucht. Tatsächlich ist die Fettsäuresynthase, das Enzym, das für die de novo Fettsäuresynthese verant-

30

wortlich ist, neulich als therapeutisches Wirkstoff-Target vorgeschlagen worden. Die vorliegende Ergebnisse legen nahe, daß es sich bei der Enoyl-Coenzym A-Hydratase um ein ähnlich geeignetes Target handelt. Dieser Zusammenhang mit dem Fettsäuremetabolismus stellt einen funktionellen Zusammenhang der Enoyl-Coenzym A-Hydratase mit FABP-3 und E-FABP her. Auch diese Fettsäure-bindenden Proteine sind in ihrer Abundanz in Krebsgewebe in charakteristischer Weise verändert. Hierbei ist FABP-3 etwa 2,5-fach herunterreguliert und E-FABP etwa 2,3-fach heraufreguliert. Neben dem Zusammenhang mit Fettsäuren wurde für FABP-3 eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle beschrieben (Seidita G. et al, 2000, Carcinogenesis 21: 2203-10). E-FABP wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Arten von Krebs beschrieben und konnte im Urin von Krebspatienten nachgewiesen werden (Brouard M. C. et al., 2002, Melanoma-Research 12: 627-31). Die von den Erfindern beobachtete erhöhte Abundanz dieses Proteins macht es insbesondere in Kombination mit den anderen Markern mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder FABP-3 und/oder Annexin A3 als diagnostischen Marker für Krebs in besonderer Weise geeignet, da hier zwischen diesen verschiedenen Proteinen ein funktioneller Zusammenhang besteht. Es können jeweils also eines dieser Proteine oder besonders vorteilhaft zwei oder drei dieser Proteine in ihrer Abundanz im Vergleich mit Kontrollen beobachtet werden, so daß durch die charakteristische Herauf- bzw. Herabregulation dieser Proteine Rückschlüsse auf das Vorliegen von Krebsgewebe gemacht werden können. Der Zusammenhang mit dem Fettsäuremetabolismus trifft auch noch auf weitere der hier beschriebenen Proteine zu, wie weiter unten ausgeführt wird.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) als diagnostischen Marker oder als therapeutisches Reagenz für Krebs. Die Erfinder konnten zeigen, daß dieses Protein in Krebsgewebe durchschnittlich etwa um das 2,7-fache bis 5,1-fache in seiner Häufigkeit erniedrigt ist. SAP ist hauptsächlich auf

stromalen Zellen von benignem Prostatagewebe zu finden, so daß seine relativ geringere Häufigkeit in Krebsgewebe durch die relativ geringere Menge an stromalen Zellen in Krebsgewebe erklärt werden könnte. Die Untersuchung der Herabregulation von SAP im Vergleich mit Kontrollen ist daher in besonderer Weise als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe geeignet. SAP ist ein Lektin-artiges Akutphasenprotein (Ergebnisse aus Mäusen) der Pentraxin-Familie und steht im Zusammenhang mit mehreren amyloiden Krankheitsbildern. Amyloide Ablagerungen werden manchmal in dem männlichen urologischen System beobachtet, allerdings ist die Biologie dazu kaum verstanden. Korrekt gefaltetes natives SAP bindet außer an amyloide Fibrillen auch Polysaccharide, einschließlich mikrobielle Polysaccharide und Matrixkomponenten, über saure Kohlenhydrat-Determinaten, Phosphoethanolamin und Phosphocholin. SAP Bestandteil von einfachen Membranen und vermittelt möglicherweise deren Wechselwirkungen mit Laminen und Phospholipiden. Es ist an der Target-Erkennung durch Phagozyten des evolutionär alten systemischen Immunsystems, beispielsweise die polymorpho-nukleären Leukozyten, beteiligt und bindet an Phospholipide auf apoptotischen Zellen und vermittelt ihre Phagozytose durch Makrophagen. Es ist seit langem bekannt, daß der Spiegel von SAP in malignem humanem Serum erhöht ist und IL-6 zumindest in dem Serum einiger Krebs-Patienten dafür verantwortlich zu sein scheint. Zusammenfassend kann angenommen werden, daß SAP an der Modulation der Wechselwirkung von nicht karzinomatösen Zellen mit ihrer Umgebung und möglicherweise an der Immunüberwachung beteiligt ist: eine Funktion, die wahrscheinlich in vielen Krebszellen gestört ist. Die Pentraxine sind durch Cytokine induzierbar und steigen in ihrer Konzentration im Blut bei Infektionen oder Trauma dramatisch an. Sie spielen also eine Rolle bei der Immunabwehr. Die vorliegenden Beobachtungen legen einen Zusammenhang zwischen Annexin A3, Ubiquitin-Isopeptidase T und der Serum-Amyloid P-Komponente bei der Immunüberwachung der Prostata

nahe, der eine veränderte Regulation der Immunüberwachung durch Exosomen zur Folge hat.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins 14-3-3  
5 Protein tau als diagnostischen Marker für Krebs. Dieses Protein ist bekanntermaßen an apoptotischen Vorgängen beteiligt. Weiterhin wurde dieses Protein bereits auch im Zusammenhang mit Krebs beschrieben. Hierbei wurde allerdings eine Anti-Onkogenizität festgestellt (He H., 1997, Gan-To-Kagaku-Ryoho 24: 1448-53). Demgegenüber konnte von  
10 den Erfindern nun überraschenderweise ein erhöhter Level (1,8-fach) von 14-3-3 Protein tau in Krebsgewebe festgestellt werden. Immunhistochemische Anfärbungsreaktionen haben gezeigt, daß das Protein 14-3-3 tau hauptsächlich in gesunden Epithelzellen sowie in Krebszellen des Prostatagewebes vorkommt. Im Stroma kommt das Protein 14-3-3 tau  
15 dagegen lediglich in Lymphozyten vor (nur Lymphozyten werden angefärbt). Erfindungsgemäß wird daher eine Heraufregulation des Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe untersucht.

20 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins nukleäres Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1) als diagnostischen Marker für Krebs, insbesondere für Prostatakrebs. Diesbezüglich konnten die Erfinder eine etwa 1,5-fache Erhöhung der Abundanz dieses Proteins in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollen feststellen. Somit wird vorzugsweise eine  
25 Heraufregulation dieses Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Krebsgewebe untersucht. Dieser intrazelluläre Anionenkanal wurde bereits im Zusammenhang mit Zellteilung und Apoptose beschrieben (Ashley R. H., 2003, Mol. Membr. Biol. 20: 1-11).

30 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins HES1 als diagnostischen Marker für Krebs. Die Erfinder konnten bei diesem Protein zeigen, daß es in Krebsgewebe in seiner Abundanz etwa vierfach



im Vergleich mit Kontrollen erhöht ist. Die T-Testwahrscheinlichkeit für eine entsprechende Heraufregulation wurde mit  $p < 0,0001$  errechnet. Es wird daher vorzugsweise eine Heraufregulation dieses Proteins im Vergleich mit Kontrollen als diagnostisches Merkmal für eine Krebserkrankung untersucht. Bei diesem Protein handelt es sich um eine bestimmte Spleißvariante (HES1/Kpn-la), dessen Funktion bisher unbekannt ist. Es enthält eine DJ1-Pfpl-Domäne, und es wird eine mitochondriale Lokalisation angenommen, was auf einen möglichen Zusammenhang mit der Funktion von Enoyl-Coenzym A-Hydratase hinweisen könnte. Dieses Protein wird in vielen humanen Geweben exprimiert. Die Erfinder konnten bei diesem Protein erstmals einen Zusammenhang mit Krebs zeigen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung der Proteasomen alpha 2-Untereinheit als diagnostischen Marker für Krebs. Auch hier konnten die Erfinder erstmals einen Zusammenhang dieses Proteins mit Krebserkrankungen feststellen. Es wurde eine etwa zweifache Erhöhung der Abundanz in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollen festgestellt. Die T-Testwahrscheinlichkeiten ergaben für dieses Protein einen Wert von  $p < 0,009$ . Vorzugsweise wird eine Heraufregulation der Proteasomen alpha 2-Untereinheit im Vergleich mit Kontrollen untersucht. Proteasomen sind bekanntermaßen an der Prozessierung der Peptidpräsentation des Immunsystems über das MHC Klasse I-System beteiligt, welches im Zusammenhang mit der Aktivität von Killer-T-Zellen steht.

25

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins Adenin-Phosphoribosyltransferase als diagnostischen Marker für Krebs, insbesondere für Prostatakrebs. Dieses Protein wurde bereits verschiedentlich im Zusammenhang mit Krebs diskutiert. Beispielsweise ist beschrieben, daß dieses Protein in Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen herunterreguliert ist. Weiterhin wurde bereits auch eine Überexpression des Proteins in colorektalem Karzinoma beobachtet. Die Erfinder konn-

30

ten nun zeigen, daß dieses Protein in Prostatakrebsgewebe etwa um das Zweifache in seiner Häufigkeit erhöht ist. Die T-Testwahrscheinlichkeiten für diese differentielle Abundanz ergaben einen Wert von  $p < 0,007$ . Erfindungsgemäß wird daher eine Heraufregulation des Proteins im Vergleich mit Kontrollen als charakteristisches Merkmal für Prostatakrebsgewebe untersucht.

Darüber hinaus umfaßt die Erfindung die Verwendung des Proteins anorganische Pyrophosphatase als diagnostischen Marker für Krebs, insbesondere für Prostatakrebs. Eine Heraufregulation dieses Proteins in Lungenkrebs und colorektalem Krebs wurde bereits gezeigt. Die Erfinder konnten nun zeigen, daß dieses Protein in Prostatakrebsgewebe im Vergleich mit Kontrollen etwa um das 1,6-fache heraufreguliert ist. Bei diesen Ergebnissen ergab sich eine T-Testwahrscheinlichkeit von  $p < 0,005$ . Die von der anorganischen Pyrophosphatase katalysierte Reaktion setzt anorganisches Phosphat frei. Dies steht im Zusammenhang mit den Kalzifizierungsprozessen, an denen Annexine, insbesondere Annexin A3, involviert sind, welche am  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluß beteiligt sind. Insbesondere zwischen der Heraufregulation von Annexin A3 und der Heraufregulation von anorganischer Pyrophosphatase könnte daher ein funktioneller Zusammenhang bestehen.

Die verschiedenen genannten Proteine sowie auch die im weiteren aufgeführten Proteine können jeweils für sich oder in Kombination mit anderen Proteinen zu diagnostischen Zwecken genutzt werden.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem der folgenden Proteine als diagnostischen Marker für Krebs: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikroseminalprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27), 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1), 14-3-3 Protein tau, Hitze-

schockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase, Aldolase A, HES1, Proteasomen alpha 2-Untereinheit, Adenin-Phosphoribosyltransferase und anorganische Pyrophosphatase. Besonders bevorzugt ist es, wenn eine Herabregulation von mindestens einem der Proteine Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) oder Transgelin im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird. Weiterhin ist es bevorzugt, wenn zusätzlich oder als Alternative hierzu eine Heraufregulation von mindestens einem der folgenden Proteine im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird: 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1), 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase, Aldolase A, HES1, Proteasomen alpha 2-Untereinheit, Adenin-Phosphoribosyltransferase und anorganische Pyrophosphatase. Besonders bevorzugt ist es, wenn zusätzlich zu einem oder mehreren dieser Proteine eine Herabregulation von anderen Annexinen untersucht wird. Weiterhin ist es besonders bevorzugt, daß mindestens zwei Proteine untersucht werden.

In besonders vorteilhafter Weise werden mindestens zwei der folgenden Proteine als diagnostische Marker verwendet: Ubiquitin-Isopeptidase T, Hitzeschockprotein 27 (HSP27), Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), Annexin A3, mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder Nucleophosmin.

Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, daß diese verschiedenen Proteine in charakteristischer Weise in Krebsgewebe im Vergleich mit gesundem Gewebe herunter- bzw. heraufreguliert sind. Einzelheiten hierzu ergeben sich aus der folgenden Tabelle 1. Hierin wird die Identifizierung und die Quantifizierung der verschiedenen Proteine in gutartigem und bösartigem Gewebe zusammengefaßt. Die Auswahl der Proteine basiert auf einer statistisch signifikanten differentiellen relativen Abundanz der Proteine in gutartigem (benigne Fraktion) und bösartigem (Krebsfraktion) Gewebe. Die *Accession Number* entspricht der jeweiligen Nummer aus der NCBI-Datenbank. Das theoretische Molekulargewicht (MW) ist das Molekulargewicht, das gemäß den Datenbanksequenzen errechnet wurde. Unter „scores“ sind die mit Hilfe der MASCOT-Technik ermittelten Treffer zu verstehen. Die Angabe zum PMF-Score bezieht sich auf den Mowse-Score, der vom MASCOT-Server verwendet wird, wobei im allgemeinen ein PMF-Score, der höher als 65 ist, eine signifikante Identifizierung repräsentiert. Die letzten zwei Spalten fassen die Quantifizierung der Proteinspot-Intensitäten zusammen, die für die gutartigen und bösartigen Gewebefraktionen gefunden wurden.

Tabelle 1:

No.	AccNo	Beschreibung	theor. MW	PMF Score	benigne Fraktion	Krebsfraktion
1	gi 1732411	isopeptidase T [Homo sapiens]	94104	115	83.6	16.4
2	gi 576259	Chain A; Serum Amyloid P Component (Sap)	23598	106	73.1	26.9
3	gi 494781	Fatty Acid Binding Protein (Holo Form, Human Muscle) (M-Fabp)	14775	87	71.6	28.4
4	gi 4504981	beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin; galactose-binding; soluble; I; galectin [Homo sapiens]	15769	177	66.2	33.8
5	gi 225159	microseminoprotein beta	12238	92	63.9	36.1
6		n.i.			60.6	39.4
7	gi 662841	heat shock protein 27 [Homo sapiens]	22667	182	60.2	39.8
8	gi 4507949	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide; 14-3-3 pr	27946	160	41.2	58.8
9	gi 4507953	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; protein kinase C inhib	27810	160	41.1	58.9
10	gi 2073569	nuclear chloride ion channel protein [Homo sapiens]	27249	139	40.1	59.9
11		n.i.			39.5	60.5
12		n.i. (Annexin A3)	36524	160	37.4	62.6
13	gi 5803227	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, theta polypeptide, 14-3-3 protein tau	28032	130	35.6	64.4
14	gi 13129150	heat shock 90kDa protein 1, alpha, heat shock 90kD protein 1, alpha [Homo sapiens]	85006	147	32.6	67.4
	gi 20149594	heat shock 90kDa protein 1, beta, heat shock 90kD protein 1, beta, Heat-shock 90kD protein-1, beta	83554	164		
15	gi 20070125	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit, v-erb-a avian erythroblastic Leukaemia viral oncogene homolog 2	57480	235	31.2	68.8
16	gi 4557581	(NM_001444) fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); E-FABP [Homo sapiens]	15497	94	27.9	72.1
17	gi 12707570	mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor [Homo sapiens]	31807	101	26.2	73.8
18	gi 16307090	Similar to nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) [Homo sapiens]	29617	77	21.9	78.1
19	gi 7768772	HES1 protein, homolog to E. coli and zebrafish ES1 protein, anti-sigma cross-reacting protein homolog 1 alpha precursor, KNP-1a, GT335, similar to E. coli SCRP27A and to zebrafish ES1 [Homo sapiens]	29215	95	<20	>80
20	gi 4506181	proteasome alpha 2 subunit; proteasome subunit HC3; proteasome component C3; macropain subunit C3; multicatalytic endopeptidase complex subunit C3 [Homo sapiens]	26236	105	32.6	67.4
21	gi 4502171	adenine phosphoribosyltransferase; AMP pyrophosphorylase; AMP diphosphorylase; transphosphoribosidase	20127	134	33	67
22	gi 11056044	inorganic pyrophosphatase [Homo sapiens]			38.6	61.4

In diesem Zusammenhang wird weiterhin auf die Fig. 5 und 10 verwiesen, in welchen in tabellarischer Form die Ergebnisse der Proteinspots mit signifikanter differentieller durchschnittlicher Abundanz bei 21 Patienten bzw. 31 Patienten zusammen mit verschiedenen statistischen Werten dargestellt sind.

Im folgenden wird eine Zusammenstellung der englischsprachigen Synonyme für diese verschiedenen Proteine aufgelistet. Hierbei entspricht die vorangestellte Nummer der Numerierung in der Tabelle 1. An erster Stelle steht jeweils die in der übrigen Beschreibung gewählte deutsche Bezeichnung dieser Proteine.

1. gi|1732411: **Ubiquitin-Isopeptidase T**; Isopeptidase T (isoT); ubiquitin specific protease 5; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5; Ubiquitin thiolesterase 5; Ubiquitin-specific processing protease 5; Deubiquitinating enzyme 5 ; de-ubiquitinase.

2. gi|576259: **Serum-Amyloid P-Komponente**; Chain A; Serum Amyloid P Component (SAP).

3. gi|494781: **Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3)**; Mammary-derived growth inhibitor (MDGI); fatty acid binding protein 3 (FABP-3); Heart-Type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP); Muscle-Type Fatty Acid Binding Protein (M-Fabp).

4. gi|4504981: **Galektin**; galectin-1; 14 kDa beta-galactoside-binding lectin; beta galactoside soluble lectin; Beta-galactoside-binding lectin L-14-I; Galaptin; soluble galactoside-binding lectin; S-Lac lectin 1.

5. gi|225159: **Mikrosemipoprotein beta**; beta-mikrosemipoprotein; mikrosemipoprotein beta; Immunoglobulin binding factor (IGBF); PN44; Prostate secreted seminal plasma protein; Prostate secretory protein of

94 amino acids (PSP-94); Seminal plasma beta-inhibin; seminal plasma protein.

6. nicht identifiziert

5

7. gi| 662841: **Hitzeschockprotein 27 (HSP27)**; heat shock protein 27; 27kDa heat shock protein 1 (HSP-27); Stress-responsive protein 27 (SRP27); Estrogen-regulated 24 kDa protein; 28 kDa heat shock protein.

10 8. gi|4507949: **14-3-3 Protein beta**; 14-3-3 protein beta (14-3-3 beta); 14-3-3 protein alpha (14-3-3 alpha); Protein kinase C inhibitor protein-1; PKC inhibitor protein-1 (KCIP-1: auch 14-3-3 zeta); RNH-1.

15 9. gi|4507953: **14-3-3 Protein zeta**; 14-3-3 zeta; 14-3-3 delta; KCIP-1 (auch 14-3-3 beta); YWHAZ; mitochondrial import stimulation factor S1 (MSF S1); Factor activating exoenzyme S; tryptophan monooxygenase activation protein zeta; tyrosine monooxygenase activation protein zeta.

20 10. gi|2073569: **nukleäres Chloridionenkanal-Protein**; chloride intracellular channel 1 (CLIC-1); nuclear chloride ion channel protein (p64CLCP); nuclear chloride channel; chloride channel ABP; Nuclear chloride ion channel 27 (NCC27); RNCC protein; Nuclear chloride ion channel 27 (NCC27).

25 11.: nicht identifiziert

12.: (Annexin A3, siehe 23.)

30 13. gi| 5803227: **14-3-3 Protein tau**; 14-3-3 tau; 14-3-3 theta; S15076 protein kinase regulator 14-3-3; HS1; tryptophan 5 -monooxygenase activation protein; tyrosine 3 -monooxygenase activation protein.

14. gi|13129150: **Hitzeschockprotein 90 (HSP90)**; Heat shock protein 90 (HSP-90); Heat shock protein HSP 90-alpha; heat shock protein 90-alpha; 90 kDa heat-shock protein; heat shock protein 86 (HSP 86); Hspca; heat shock 90kDa protein 1; heat shock protein 1; Tumor specific  
5 transplantation 86 kDa antigen (TSTA).

15. gi|20070125: **Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)**; protein disulfide isomerase (PDI); Prolyl-4-hydroxylase beta; protein disulfide oxidoreductase; thyroid hormone binding protein p55; glutathione insulin trans-  
10 hydrogenase.

16. gi|4557581: **epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP)**; Fatty acid binding protein 5 (FABP-5); epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP); Psoriasis-associated fatty acid-binding protein (PA-FABP);  
15 cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP); keratinocyte lipid binding protein (KLBP); DA11.

17. gi|12707570: **mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase**; Mitochondrial Enoyl Coenzyme A hydratase; Mitochondrial enoyl-CoA hydratase; short-chain enoyl-CoA hydratase, mitochondrial; short-chain enoyl-coenzyme A hydratase (SCEH).  
20

18. gi|16307090: **Nukleophosmin**; Nucleophosmin; nucleolar phosphoprotein B23; Nucleolar protein NO38; numatrin; NPM(1).  
25

19. gi|7768772: **HES1 Protein**, homolog zu E. coli und Zebrafisch ES1 Protein, anti-sigma cross-reacting protein homolog I alpha precursor, KNP-Ia/Kpn-I alpha, GT335, ähnlich zu E. coli SCRP27A und zu Zebrafisch ES1 [Homo sapiens].  
30



20. gi|4506181: **Proteasomen alpha 2-Untereinheit**; proteasome subunit HC3, proteasome component C3; macropain subunit C3; multicatalytic endopeptidase complex subunit C3 [Homo sapiens].
- 5 21. gi|4502171: **Adenine-Phosphoribosyltransferase**; AMP pyrophosphorylase; AMP diphosphorylase; transphosphoribosidase.
22. gi|11056044: **anorganische Pyrophosphatase**; cytosolic inorganic pyrophosphatase; inorganic pyrophosphatase 1; pyrophosphate  
10 phospho-hydrolase [Homo sapiens].

Darüber hinaus konnten noch vier weitere Proteine identifiziert werden, die jeweils in Krebsgewebe verglichen mit Kontrollgewebe in bestimmten Patientengruppen (Clusteranalyse) heraufreguliert bzw. herabreguliert  
15 sind. Und zwar handelt es sich hierbei um die Proteine Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A. Annexin A3 wird in Krebsgewebe etwa 5-fach heraufreguliert und Transgelin wird etwa 5-fach herabreguliert. Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A wird jeweils in Krebsgewebe um etwa 20 % bzw. etwa 10 % heraufreguliert.

20

In diesem Zusammenhang wird auf die Fig. 3 verwiesen, die in graphischer Weise die Ergebnisse der Clusteranalyse darstellt. Hieraus ergibt sich die Herauf- bzw. Herabregulation verschiedener Proteine in Krebsgewebe bestimmter Patientengruppen bzw. bestimmter Cluster, die jeweils durch einen Kreis dargestellt sind, im Vergleich mit gesundem  
25 Gewebe.

Die englischsprachigen Synonyme für Annexin A3 und Transgelin lauten folgendermaßen:

30

23. gi|4826643: **Annexin A3**; Annexin III; lipocortin III; anticoagulant protein III; Placental anticoagulant protein III (PAP III); 35 alpha calcimedin.

24. gi|4507359: **Transgelin**; SM22-alpha smooth muscle protein, 22 kDa actin-binding protein, Smooth muscle 22 protein, Actin-associated protein p27, 25 kDa F-actin-binding protein.

- 5 Zusätzlich wurden noch weitere Proteine identifiziert, die im Vergleich von Krebsgewebe mit Kontrollgewebe in bestimmten Patientengruppen abweichende Abundanz zeigten bzw. herauf- bzw. herabreguliert waren. Bei diesen Proteinen handelt es sich um ATP-Synthase, Biliverdin-Reduktase B, Glucose-reguliertes Protein, Prolyl 4-Hydroxylase beta  
10 und dnak-artiges molekulares Chaperone. Und zwar ist die ATP-Synthase herabreguliert und die übrigen dieser Proteine sind heraufreguliert.

Interessanterweise weisen viele der identifizierten Proteine eine Beziehung zum Lipidmetabolismus auf. Für Annexin A3 und SAP wurde eine  
15 direkte Bindung an Lipide beschrieben. Beide Proteine sind an phagozytotischen Vorgängen beteiligt. Mit FABP-3 und E-FABP wurden zwei Fettsäure-bindende Proteine identifiziert. Die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase ist an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. Die Aktivität von HSP27 wird durch die Aktivität der Protein-Kinase C  
20 stimuliert, die selbst durch die Aktivität von Phospholipasen beeinflusst wird, welche Phospholipide umsetzen. Auch HSP90 beeinflusst den Phospholipid-Stoffwechsel, da eine Inhibierung von HSP90 in einem veränderten Phospholipid-Metabolismus resultiert (Chung Y. L. et al., 2003, J. Natl. Cancer Inst. 95: 1624-33). Weiterhin ist PDI vermutlich  
25 ebenfalls mit dem Lipid-Metabolismus verknüpft, da PDI als ein multifunktionales Protein wirkt, welches u.a. am Triglycerid-Transfer beteiligt ist (Horiuchi R. and Yamauchi K., 1994, Nippon-Rinsho 52: 890-5). Darüberhinaus hemmen die 14-3-3 Proteine die Aktivität der Protein-Kinase C und enthalten konservierte Sequenzen, die der Pseudosubstrat-  
30 Domäne der Protein-Kinase C und dem C-Terminus der Annexine ähneln. Dies deutet alles darauf hin, dass eine funktionelle Beziehung zwischen diesen verschiedenen Proteinen besteht.

Mit den erfindungsgemäß verwendeten diagnostischen Markern können verschiedene Arten von Tumoren und Krebserkrankungen nachgewiesen werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der zu diagnostizierenden Krebserkrankung um Prostatakrebs, insbesondere um ein Prostatakarzinom. Wie schon eingangs erwähnt, stellen Prostatakarzinome die häufigsten malignen Tumore bei Männern dar. Nur wenn ein Prostatatumor in einem frühen Stadium nachgewiesen werden kann, kann eine vorbeugende chirurgische Entnahme der Prostata eine erfolgsversprechende Therapie sein.

5 Für die fortgeschrittene, nicht mehr auf ein Organ begrenzte Erkrankung ist eine vorbeugende Entnahme der Prostata nicht mehr ausreichend. Für diese zum Teil inoperativen Prostatatumore kann eine Hemmung der männlichen Sexualhormone in Betracht gezogen werden. Eine solche Hemmung, vorzugsweise in Kombination mit einer chirurgischen oder pharmakologischen Kastration, inhibiert zum Teil die Proliferation und Metastasierung des Tumors und erlaubt damit dessen Kontrolle für einen gewissen Zeitraum. Die meisten Prostatatumore entwickeln allerdings mit der Zeit eine gewisse Resistenz gegenüber dieser endokrinologischen Therapie. Andere Therapiemöglichkeiten, wie z. B. die Verwendung von cytotoxischen Agenzien, Gentherapie oder Immunotherapie befinden sich in der klinischen Erprobung, konnten bisher leider noch keinen durchschlagenden Erfolg erzielen. Dies macht es erforderlich, daß ein Prostatakrebs möglichst in einem sehr frühen Stadium erkannt wird, so daß dann noch mit Erfolg chirurgisch behandelt werden kann.

10 15 20 25 Die beschriebenen, erfindungsgemäßen diagnostischen Markerproteine sind mit großen Vorteil zur Früherkennung von Prostatakrebs geeignet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung kann durch die Untersuchung von vorzugsweise mehreren der genannten Proteine eine bestimmte Unterart von Krebs, insbesondere eine Unterart von Prostatakrebs, diagnostiziert werden. Die Erfinder konnten zeigen, daß bei einer sogenannten Clusteranalyse be-

30

stimmte Proteinmuster eine charakteristische Herauf- bzw. Herabregulation verschiedener Proteine widerspiegeln, welche mit bestimmten Patientengruppen korrelieren. Hierbei weisen die Patienten einer Gruppe jeweils eine bestimmte Unterart von Krebs, insbesondere von Prostatakrebs, auf. Erfindungsgemäß ist es daher vorgesehen, daß durch die Analyse bestimmter Proteinmuster der Patient einer bestimmten Patientengruppe bzw. Unterart von Krebs zuzuordnen ist, so daß mit besonderem Vorteil diese bestimmte Unterart des Krebses gezielt behandelt werden kann. Hierbei werden vorteilhafterweise bestimmte Kombinationen von Proteinen analysiert. Es wird diesbezüglich auf die Fig. 3 verwiesen, welche in graphischer Weise die Proteinmuster darstellt, welche für die verschiedenen Patientengruppen charakteristisch sind. Fig. 4 zeigt in tabellarischer Form eine Zusammenfassung der Proteinmuster, die die verschiedenen Patientengruppen bzw. Unterarten von Prostatakrebs repräsentieren.

Für eine Diagnose der verschiedenen Unterarten von Prostatakrebs wird vorteilhafterweise eine Kombination verschiedener Proteine in ihrer Abundanz untersucht. Hierbei wird zunächst mindestens eines der folgenden Proteine als allgemeiner Krebsmarker analysiert: heraufreguliertes Nukleophosmin, heraufregulierte Protein-Disulfid-Isomerase, heraufreguliertes Annexin A3, heraufreguliertes Hitzeschockprotein 90, heraufregulierte mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, herabreguliertes Hitzeschockprotein 27 und/oder herabregulierte Ubiquitin-Isopeptidase T. Diese Proteine werden in Kombination mit mindestens einem der folgenden Proteine für die drei Unterarten (Patientengruppen) von Prostatakrebs analysiert.

Unterart a: heraufreguliertes Transgelin, stark herabreguliertes Galektin, stark herabreguliertes Mikroseminoprotein beta, herabreguliertes Fettsäure-bindendes Protein 3, keine oder geringe Veränderungen von epidermalem Fettsäure-bindenden Protein, keine oder geringe Verände-

runge des nukleären Chloridionenkanal-Proteins, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins beta, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins zeta, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins tau, keine oder geringe Veränderungen der Aldolase A, 5 keine oder geringe Veränderungen der Serum-Amyloid P-Komponente, keine oder geringe Veränderungen der Triosephosphat-Isomerase und/oder keine oder geringe Veränderungen von Annexin A3.

Unterart b: stark heraufregulierte Protein-Disulfid-Isomerase, stark heraufreguliertes Hitzeschockprotein 90, stark herabregulierte Ubiquitin-Isopeptidase T, heraufreguliertes 14-3-3 Protein beta, heraufreguliertes 14-3-3 Protein zeta, heraufreguliertes 14-3-3 Protein tau, heraufregulierte Aldolase A, heraufregulierte Triosephosphat-Isomerase, heraufreguliertes Annexin A3, herabreguliertes Transgelin, herabreguliertes Galek- 15 tin, herabreguliertes Mikrosemipoprotein beta, herabregulierte Serum-Amyloid P-Komponente, keine oder geringe Veränderungen des Fettsäure-bindenden Proteins 3 und/oder keine oder geringe Veränderungen des nukleären Chloridionenkanal-Proteins.

Unterart c: stark heraufreguliertes nukleäres Chloridionenkanal-Protein, herunterregulierte Serum-Amyloid P-Komponente, keine oder geringe Veränderungen des Fettsäure-bindenden Proteins 3, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins beta, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins zeta, keine oder geringe Veränderungen des 14-3-3 Proteins tau, keine oder geringe Veränderungen der Aldolase A, 25 keine oder geringe Veränderungen der Triosephosphat-Isomerase, geringe Veränderungen von Annexin A3, keine oder geringe Veränderungen des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins, keine oder geringe Veränderungen von Mikrosemipoprotein beta, keine oder geringe Veränderungen von Galektin und/oder keine oder geringe Veränderungen 30 von Transgelin.

Erfindungsgemäß kann es vorgesehen sein, zur Diagnose der verschiedenen Unterarten von Prostatakrebs mindestens einen allgemeinen Krebsmarker in Kombination mit mindestens Annexin A3 als weiterem Protein zu analysieren.

5

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform kann durch die ausschließliche Untersuchung von Annexin A3 und/oder mitochondrialer Enoyl-Coenzym A-Hydratase eine bestimmte Unterart von Prostatakrebs diagnostiziert werden, die in bestimmten Patientengruppen auftritt.

10

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der beschriebenen Proteine als diagnostische Marker können verschiedene Methoden eingesetzt werden, um die Häufigkeit bzw. Abundanz der Proteine in Krebsgewebe (bzw. in zu untersuchendem Gewebe) im Vergleich mit Kontrollgewebe zu analysieren. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Proteine der zu untersuchenden Probe und der Kontrollprobe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, beispielsweise auf einem üblichen Polyacrylamidgel. Anschließend wird die Abundanz der jeweiligen Proteine in Probe und Kontrolle miteinander verglichen. Wegen der erforderlichen Auflösung sind hierbei vor allem zweidimensionale Gele bevorzugt. Andererseits ist es auch möglich, vor der gelelektrophoretischen Auftrennung eine Vorreinigung vorzunehmen, so daß auch beispielsweise mit einer eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine ausreichende Auftrennung und Analysierbarkeit erreicht wird. Auch andere Methoden zur Auftrennung von Proteinen können mit Vorteil eingesetzt werden, beispielsweise übliche chromatographische Methoden, insbesondere säulenchromatographische Methoden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die zu untersuchende Probe und die Kontrollprobe auf unterschiedliche Weise markiert wird, beispielsweise durch verschiedene Isotope. Hierdurch wird ein Vergleich der zu untersuchenden Probe mit der Kontrolle in Bezug auf die Abundanz der jeweiligen Proteine erleichtert. In einer

15

20

25

30

weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die zu analysierenden Proteine massenspektrometrisch untersucht, um eine genaue Identifizierung der Proteine zu ermöglichen. So ist z.B. die „Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation“-Methode (SELDI-Methode) bei Geweben oder  
5 Körperflüssigkeits-Präparaten anwendbar. Aber auch in vivo bildgebende Verfahren, insbesondere Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können mit Vorteil eingesetzt werden.

Weiterhin werden die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe von Molekü-  
10 len qualitativ und quantitativ charakterisiert, die gegen die jeweils zu untersuchenden Proteine, die als diagnostische Marker verwendet werden, gerichtet sind. In besonders vorteilhafter Weise handelt es sich bei den Molekülen um Antikörper, insbesondere um polyklonale und/oder monoklonale Antikörper.

15 Aber auch alle anderen dem Fachmann in diesem Zusammenhang bekannten Affinitätsreagenzien sollen vom Gegenstand der Erfindung erfasst sein.

Zum qualitativen und vor allem quantitativen Nachweis können übliche Immunoassays eingesetzt werden, wie beispielsweise herkömmliche  
20 *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Weiterhin können auch immunohistochemische Verfahren und/oder ProteinChips eingesetzt werden. So ist z.B. auch die SELDI-Methodik anwendbar. Für den Nachweis können beispielsweise Körperflüssigkeiten oder Tumorgewebe untersucht werden. Insbesondere für den Nachweis von Annexin A3,  
25 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein tau, 14-3-3 Protein zeta und/oder SAP sind Antikörper geeignet. Beispielsweise färbt der Pan anti 14-3-3 beta/zeta monoklonale Antikörper ( Stressgen Katalognummer KAM-CC012C) Epithel- und Krebszellen sowie einige Lymphozyten im Stroma an. Der Maus monoklonale Antikörper gegen das Protein Serum-  
30 Amyloid P-Komponente (SAP) (Stressgen Katalognummer HYB 281-05, Arbeitsverdünnung 1:10) färbt das Stroma aber keine Epithel- oder Krebszellen an.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der qualitative und quantitative Nachweis der diagnostischen Markerproteine mit Hilfe von Oligonukleotiden, die beispielsweise im Zuge einer üblichen Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden können. Hierbei handelt es sich um ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte oder auch RNA-Abschnitte amplifiziert werden. Hierdurch kann ein qualitativer und auch quantitativer Nachweis der zu untersuchenden Proteine auf DNA- bzw. RNA-Ebene erfolgen. Weiterhin können mit geeigneten Oligonukleotiden sogenannte Hybridisierungsversuche durch beispielsweise herkömmliche Northern- oder Southern-Blots durchgeführt werden, wodurch ebenfalls qualitative und quantitative Aussagen zu den Proteinen auf RNA- oder DNA-Ebene gemacht werden können. Der Vorteil dieser Nachweismethoden mit Oligonukleotiden liegt in der guten Automatisierbarkeit dieser Vorgehensweisen. Andererseits muß auch berücksichtigt werden, daß hierdurch nicht zwangsläufig Aussagen über die eigentliche Abundanz des Proteins gemacht werden, sondern lediglich Aussagen zur Häufigkeit der entsprechenden DNA- bzw. RNA-Abschnitte. In diesem Fall muß also vorab geklärt werden, ob die charakteristische Herab- bzw. Heraufregulation der jeweiligen diagnostischen Markerproteine beispielsweise auf mRNA-Ebene erfolgt, oder ob die Regulierung auf einer der Transkription nachgeschalteten Ebene bewerkstelligt wird.

Die erfindungsgemäß festgestellte charakteristische Veränderung der Abundanz der verschiedenen Proteine gegenüber Kontrollgeweben wirkt sich insbesondere auch auf die Aktivität der jeweiligen Proteine, beispielsweise auf deren enzymatische Aktivität, aus. Daher ist es weiterhin bevorzugt, daß neben der Untersuchung der Abundanz oder als Alternative dazu die Aktivität der jeweiligen Proteine bestimmt wird und mit Kontrollen verglichen wird. Auch dies ist unter der Herauf- bzw. Herabregulation der verschiedenen Proteine zu verstehen. Eine entsprechende



Untersuchung kann beispielsweise durch übliche enzymatische Tests erfolgen, die sich für die jeweiligen Proteine dem Fachmann erschließen. Weiterhin können beispielsweise im Fall der Fettsäure-bindenden Proteine entsprechende Bindungsassays oder vergleichbares durchgeführt werden, um so Erkenntnisse über die Aktivität bzw. die Herauf- oder Herabregulation dieser Proteine zu gewinnen. Ähnliches gilt auch für die anderen Proteine. Beispielsweise können bestimmte Kanalaktivitäten gemessen werden, um Aussagen über das nukleäre Chloridionenkanal-Protein (CLIC-1) machen zu können. Dies kann für die Verwendung der verschiedenen Proteine als diagnostische Marker bzw. den im folgenden beschriebenen erfindungsgemäßen Diagnosekit ausgenutzt werden. Weiterhin kann eine derartige Messung der Aktivität der jeweiligen Proteine durchgeführt werden, um die Wirkung eines Wirkstoffs zu testen, der erfindungsgemäß zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs verwendet wird, wie nachfolgend beschrieben wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden für eine Untersuchung des mindestens einen Proteins Exosomen aus beispielsweise Patientenmaterial isoliert und bezüglich des oder der Proteine analysiert. Insbesondere wird das Proteinmuster eines oder mehrerer Proteine innerhalb der Exosomen untersucht, so daß hiermit die diagnostisch relevante Herauf- und/oder Herabregulation einzelner oder mehrerer Proteine festgestellt werden kann. Eine geeignete Isolierung der Exosomen aus beispielsweise Patientenmaterial kann mit üblichen Methoden erfolgen, die dem Fachmann geläufig sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung einen Diagnosekit, welcher mindestens eine Substanz zum Nachweis der Aktivität und/oder Abundanz von mindestens einem der beschriebenen Proteine umfaßt, welche als diagnostische Marker gemäß der obigen Beschreibung verwendet werden. Mit

Hilfe dieses Diagnosekits wird vorzugsweise die Aktivität und/oder Abundanz von mindestens einem der folgenden Proteine aus Tabelle 1 nachgewiesen: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), nukleäres Chloridionenkanal-Protein, mitochondriale Enoyl-  
5 Coenzym A-Hydratase und/oder Annexin A3. Vor allem dient ein solcher Diagnosekit dazu, die jeweilige Abundanz von mindestens einem dieser Proteine zu bestimmen, die gegenüber Kontrollen in charakteristischer Weise in Krebsgewebe herauf- oder herunterreguliert ist. Die Abundanz spiegelt hierbei in erster Linie die Expression des Protein wider. Der er-  
10 findungsgemäße Diagnosekit ist in vorteilhafter Weise zur Erkennung oder zum Screening von Krebserkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs, geeignet, wobei hierdurch in besonders vorteilhafter Weise eine Früherkennung solcher Krankheiten ermöglicht wird. Beispielsweise kann mit einem solchen Diagnosekit oder mit der erfindungsgemäßen  
15 Verwendung der beschriebenen Markerproteine auch zwischen gutartigem oder gesundem und bösartigem Gewebe unterschieden werden, beispielsweise zwischen benignem Prostatahyperplasia-Gewebe und Prostatakrebsgewebe. Bevorzugterweise enthält ein solcher Diagnosekit einen oder mehrere Antikörper oder ein oder mehrere Oligonukleotide  
20 bzw. Oligonukleotidpaare, die mit einem oder mehreren der beschriebenen Proteine bzw. der entsprechenden Nukleinsäuren wechselwirken. Mit Hilfe dieser Substanzen können somit qualitative und vor allem quantitative Aussagen zu diesen Proteinen im Vergleich mit Kontrollen getroffen werden.

25

Die zu untersuchenden Proben und die Kontrollproben stammen im allgemeinen aus dem Körper eines Patienten, wobei beispielsweise Gewebeproben oder auch Proben aus Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Serum, Lymphflüssigkeit oder Urin, entnommen und in der  
30 für einen Fachmann geläufigen Weise aufbereitet werden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn potentiell bösartiges Gewebe, also das typischerweise zu untersuchende Gewebe, und Kontrollgewebe, also gutar-

tiges Gewebe, aus dem selben Patienten entnommen werden und direkt miteinander verglichen werden. Andererseits ist es auch möglich, die Abundanz der jeweiligen Proteine mit anderen Standards zu vergleichen, die beispielsweise aus einer Vielzahl von unabhängigen Kontrollproben statistisch ermittelt werden. Im Fall von Prostatakrebs wird vorteilhafterweise benignes und potentiell malignes Prostatagewebe aus einem Patienten entnommen, der z.B. einer Prostatektomie oder Biopsie unterzogen wird. Bei dem Kontrollgewebe kann es sich beispielsweise um gutartiges Prostatahyperplasia-Gewebe handeln.

10

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Diagnose von Krebserkrankungen, wobei mindestens eines der beschriebenen Proteine in seiner Abundanz und/oder Aktivität analysiert wird. Durch die Analyse der erfindungsgemäß festgestellten Herab- bzw. Heraufregulation dieser Proteine in Krebsgewebe können aus diesen Untersuchungsergebnissen Rückschlüsse für das Vorliegen von Krebsgewebe gezogen werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieses erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

20 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der mit dem Protein Annexin A3 wechselwirkt, insbesondere die Aktivität und/oder Abundanz von Annexin, insbesondere von Annexin A3, beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs, vorzugsweise von bestimmten Patientengruppen von Prostatakrebs. Erfindungsgemäß kann es bevorzugt sein, daß der Wirkstoff direkt mit dem Protein Annexin A3 wechselwirkt und auf diese Weise insbesondere dessen Aktivität und/oder Abundanz beeinflusst, vorzugsweise hemmt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann es aber vorteilhaft sein, daß der Wirkstoff  
30 indirekt mit dem Protein Annexin A3 wechselwirkt, indem der Wirkstoff beispielsweise gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von Annexin A3 gerichtet ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung handelt es sich bei dem Wirkstoff um mindestens ein Benzodiazepin-Derivat (Hofmann et al. (1998), J. Biol. Chem. 273 (5): 2885-2894). Besonders bevorzugt ist hierbei BDA250 (1,3-Dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one), BDA452 (3-(R,S)-(L-Tryptophanyl)-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) und/oder BDA753 (3-(R,S)-all-L-(NH-Trp-Gly-Tyr-Ala-H)-1,3-Dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one). Weiterhin ist auch die Verwendung von Diazepam (7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) bevorzugt. Auch weitere von diesen Substanzen abgeleitete Moleküle können mit Vorteil erfindungsgemäß eingesetzt werden. Es handelt sich hierbei insbesondere um solche Moleküle, die die Aktivität von Annexin A3 blockieren.

15 In besonderer Weise eignet sich als Wirkstoff weiterhin ein Annexin A3-spezifischer Antikörper. Besonders bevorzugt sind therapeutische Antikörper. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um blockierende Antikörper und/oder um radioaktiv markierte und/oder Toxin-markierte Antikörper. Die radioaktiv markierten Antikörper können beispielsweise <sup>131</sup>I tragen. Mit derartigen Antikörpern kann mit Vorteil eine sogenannte Radio-Immunotherapie durchgeführt werden, wie sie dem Fachmann geläufig ist.

20 Weiterhin eignet sich als Wirkstoff aber auch jedes andere dem Fachmann bekannte Reagenz.

30 In besonders bevorzugter Weise kann mit derartigen Wirkstoffen die Aktivität und/oder Abundanz von Annexin A3 in Exosomen beeinflusst werden.

Wirkstoffe, die die Aktivität und/oder die Abundanz von Annexin A3 beeinflussen, insbesondere hemmen, können weiterhin mit Vorteil zur Her-

stellung eines Medikaments zur Behandlung von osteoarthritischem Knorpelabbau und/oder arteriosklerotischen Läsionen eingesetzt werden.

- 5 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder die Aktivität und/oder die Abundanz der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs. Wie bereits beschrieben, ist die Häufigkeit bzw. Abundanz dieser Proteine in Krebsgewebe in charakteristischer Weise verändert. Insbesondere ist die Abundanz der Ubiquitin-Isopeptidase T deutlich erniedrigt und die Abundanz der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) erhöht. Die Beeinflussung der Aktivität und/oder der Abundanz dieser Proteine hin zu dem normalen Maß, wie es beispielsweise in Kontrollgeweben verwirklicht ist, stellt daher einen Therapieansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Es wird daher zum einen die Verwendung eines Wirkstoffs beansprucht, der die Aktivität und/oder die Abundanz der Ubiquitin-Isopeptidase T steigert. Zum anderen wird die Verwendung eines Wirkstoffs beansprucht, der die Aktivität und/oder die Abundanz der PDI hemmt. Durch derartige Wirkstoffe wird die Aktivität der erwähnten Proteine auf das übliche Maß reguliert, wodurch eine Krebserkrankung wirksam behandelt werden kann.

- Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem  
25 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs. Vorzugsweise kann dies in Kombination mit einer Beeinflussung des Fettsäure-bindenden Proteins 3 (FABP-3) und/oder des epidermalen Fettsäure-bindenden Proteins (E-FAPB)  
30 vorgenommen werden. Hierbei ist es bevorzugt, wenn ein hemmender Wirkstoff für die Aktivität und/oder Abundanz der mitochondrialen Enoyl-

Coenzym A-Hydratase und/oder des E-FABP bzw. ein steigender Wirkstoff für die Aktivität und/oder Abundanz des FABP-3 eingesetzt wird.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem  
5 Wirkstoff, der die Aktivität, Abundanz und/oder Lokalisation der Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs. Es wurde gezeigt, daß die Lokalisation von SAP bei Krebserkrankungen verändert sein kann. Daher kann es erfindungsgemäß bevorzugt sein, daß die Lo-  
10 kalisation von SAP durch Verwendung von mindestens einem Wirkstoff beeinflusst wird. Bei dem Wirkstoff könnte es sich beispielsweise um ein Fusionsprotein, das aus einer krebszellbindenden Domäne von Annexin A3 und einer Immunreaktions-beeinflussenden Domäne von SAP besteht, handeln. SAP befindet sich beispielsweise in Prostatagewebe auf  
15 stromalen Zellen, jedoch nicht auf gesunden Epithelzellen oder transformierten Krebszellen. Annexin A3 ist abundanter in Krebsgewebe. Es ist auch bekannt, daß Annexine auf der Oberfläche von Zellen vorkommen. Da SAP als Proteinkomponente am Immunsystem beteiligt ist und Krebszellen vom Immunsystem nicht eliminiert werden, könnte eine Im-  
20 munreaktions-beeinflussende Domäne von SAP auf der Oberfläche von Krebszellen eine veränderte Immunreaktion gegenüber Krebszellen verursachen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem  
25 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins 14-3-3 beta Protein beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem  
30 Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des nukleären Chloridionenkanal-1-Proteins beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung

eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Prostatakrebs.

- 5 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins HES1 beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

- 10 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz der Proteasomen alpha 2-Untereinheit beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

- 15 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins Adenin-Phosphoribosyltransferase beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.

- 20 Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins anorganische Pyrophosphatase beeinflusst, insbesondere in Exosomen, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.

- 25 Darüber hinaus umfaßt die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz von mindestens einem der folgenden Proteine beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Annexin A3, Galektin, Mikroseminalprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Transgelin. Darüber hinaus umfaßt  
30 die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die

Aktivität und/oder Abundanz von mindestens einem der folgenden Proteine beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs: 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-1-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), epidermales Fettsäure-bindendes Protein (E-FABP), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Triosephosphat-Isomerase, Aldolase A, HES1, Proteasomen alpha 2-Untereinheit, Adenin-Phosphoribosyltransferase und anorganische Pyrophosphatase. Besonders bevorzugt ist es, wenn zwei oder mehr Wirkstoffe gegen mindestens zwei verschiedene Proteine miteinander kombiniert werden. Darüber hinaus ist es bevorzugt, daß in Kombination mit einem oder mehreren dieser Wirkstoffe ein weiterer Wirkstoff eingesetzt wird, der die Aktivität und/oder Abundanz von Annexin A1, Annexin A2, Annexin A4, Annexin A7 und/oder Annexin A10, insbesondere in Exosomen, steigert.

Bei allen diesen Proteinen wurde erfindungsgemäß gezeigt, daß sie in charakteristischer Weise in Krebsgewebe im Vergleich mit Kontrollzellen herauf- bzw. herabreguliert werden. Daher wird es erfindungsgemäß beansprucht, diese Proteine in jeweils entgegengesetzter Weise durch entsprechende Wirkstoffe herab- bzw. heraufzuregulieren, um so die Aktivitäten, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten, von gesunden Kontrollgeweben zu erreichen bzw. die Krebszellen zu hemmen und/oder zu töten. Hierdurch können verschiedene Krebserkrankungen erfolgreich behandelt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Prostatakrebs, vorzugsweise von bestimmten Unterarten von Prostatakrebs.

Bei den erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffen kann es sich beispielsweise um Peptide, Proteine, sogenannte „*small molecular compounds*“ oder Polynukleotide handeln. Hierbei kann es sich jeweils um



bekannte Wirkstoffe handeln, die die Aktivität und/oder Abundanz der verschiedenen Proteine in bekannter Weise beeinflussen, oder es kann sich um neue Wirkstoffe handeln. Diese Wirkstoffe können direkt an den beschriebenen Proteinen angreifen. Andererseits kann es auch bevorzugt sein, wenn diese Wirkstoffe Regulatoren, insbesondere Aktivatoren  
5 zugt sein, wenn diese Wirkstoffe Regulatoren, insbesondere Aktivatoren oder Inhibitoren, und/oder biologische Vorläufer dieser verschiedenen Proteine beeinflussen. Je nachdem, ob bei der Beeinflussung durch den Wirkstoff eine Hemmung oder eine Steigerung der Aktivität und/oder der Abundanz des jeweiligen Proteins bevorzugt ist, kann es sich bei dem  
10 Wirkstoff um einen Agonisten oder einen Antagonisten handeln. Als Antagonisten kommen beispielsweise *deficient*-Mutanten oder *dominant-negative*-Mutanten, die durch molekularbiologische Methoden konstruierbar sind, in Frage. Sie sind beispielsweise enzymatisch inaktiv, konkurrieren jedoch mit dem jeweiligen Substrat des zu hemmenden  
15 Proteins oder Enzyms, so daß die Aktivität des Proteins im Ergebnis herabgesetzt wird. Ein weiteres Beispiel für einen antagonistisch wirkenden Wirkstoff sind *antisense*-Moleküle, die in bekannter Weise die Abundanz eines bestimmten Proteins herabsetzen können. Als agonistisch wirksame Substanzen können beispielsweise Substanzen eingesetzt werden, die die Abundanz eines bestimmten Gens bzw. die Um-  
20 setzung von mRNA in das aktive Genprodukt fördern. Hierbei kann es sich beispielsweise um spezifische Transkriptionsfaktoren oder ähnliches handeln, die den Expressionslevel der genannten Proteine regulieren. Insbesondere kleinmolekulare Chemikalien können hierbei mit Vor-  
25 teil eingesetzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann es sich bei dem Wirkstoff um einen therapeutischen Antikörper handeln. Dieser kann als hemmende Antikörper die Aktivität des jeweiligen Prote-  
30 ins, vorzugsweise von Annexin A3, vermindern oder blockieren. Weiterhin kann der therapeutische Antikörper dadurch gekennzeichnet sein, daß er z.B. eine toxische oder radioaktive Markierung trägt und durch

bloße Wechselwirkung mit z.B. Annexin A3 diese Markierung an die Krebszellen heranträgt. Dies kann beispielsweise im Zuge einer sogenannten Radio-Immunotherapie eingesetzt werden, wobei die Antikörper eine radioaktive Markierung, z. B.  $^{131}\text{I}$ , tragen.

5

Weiterhin kann es erfindungsgemäß vorgesehen sein, daß es sich bei dem Wirkstoff um ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht (MG) <1000 zur Inhibierung der Ionenkanalaktivität in Membranen, vorzugsweise der Exosomen und/oder Matrixvesikel, handelt.

10

Zur Steigerung der Aktivität der beschriebenen Proteine, vor allem der Ubiquitin-Isopeptidase T, von FABP-3, SAP, Galektin, Mikroseminoprotein beta, HSP27 und Transgelin, kann beispielsweise eine Komponente eingesetzt werden, die eine vergleichbare oder ähnliche enzymatische Aktivität entwickelt. Weiterhin kann durch einen entsprechenden Wirkstoff die Aktivität der bereits vorhandenen Enzymmoleküle induziert oder gesteigert werden. Andererseits ist es auch möglich, mit geeigneten Wirkstoffen die Expression, also die Synthese, entsprechender enzymatischer Moleküle zu induzieren oder zu steigern. Hierbei kann der Wirkstoff beispielsweise auch an bestimmten Vorläufermolekülen, Regulatoren, Aktivatoren oder Inhibitoren von Enzymen oder anderen Proteinen angreifen.

Weiterhin können auch Hormone oder ähnlich wirksame Substanzen als Wirkstoffe eingesetzt werden, wenn sie die Aktivität des jeweiligen Proteins in gewünschter Weise beeinflussen. So können beispielsweise Progesteron-Analoga eingesetzt werden, um die mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase zu hemmen.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung handelt es sich bei dem Wirkstoff um mindestens eines der folgenden Proteine selbst: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-

Amyloid P-Komponente, Fettsäure-bindendes Protein 3, Galektin, Mikroseminoprotein beta, Hitzeschockprotein 27 und/oder Transgelin. Bei diesen Proteinen konnten die Erfinder zeigen, daß diese Proteine in Krebsgewebe in ihrer Abundanz erniedrigt sind, so daß es erfindungsgemäß  
5 vorgesehen ist, zur Steigerung von deren Aktivität und/oder Abundanz diese Proteine selbst als Wirkstoff einzubringen. Hierbei kann es sich um einzelne dieser Proteine oder vorzugsweise um Kombinationen von verschiedenen dieser Proteine handeln. Weiterhin kann es vorgesehen sein, daß Teile dieser Proteine, beispielsweise Peptide, oder von den  
10 Proteinen abgeleitete Moleküle erfindungsgemäß als Wirkstoff verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird der oder die Wirkstoffe in Form von Exosomen  
15 bereitgestellt bzw. erfolgt die Verabreichung des oder der Wirkstoffe durch eine Vermittlung über Exosomen. Hierdurch kann in besonders vorteilhafter Weise die Immunantwort des Patienten beeinflusst werden, und insbesondere die T-Zellantwort moduliert werden. Exosomen sind Membranvesikel, die insbesondere von hämatopoetischen Zellen sekre-  
20 tiert werden. Bekanntermaßen induzieren Exosomen, die von dendritischen Zellen herkommen, eine wirksame Antitumor-Immunantwort, beispielsweise in Mäusen.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines Wirkstoffs zur Behandlung von Krebs wird vorteilhafterweise erreicht, daß die Entwicklung  
25 oder das Wachstum eines Tumors vermindert oder gehemmt wird, und/oder daß eine Metastasierung von Tumoren zumindest teilweise verhindert oder vollständig vermieden wird.

30 Weiterhin umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff gemäß der obigen Beschreibung sowie mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist.

Bezüglich Einzelheiten zu dieser pharmazeutischen Zusammensetzung bzw. zu dem Wirkstoff wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Geeignete pharmazeutisch akzeptable Träger erschließen sich dem Fachmann.

5

Weiterhin umfaßt die Erfindung auch ein Verfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen, beispielsweise von Prostatakrebs, wobei mindestens einer der beschriebenen Wirkstoffe verabreicht wird. Bezüglich weiterer Merkmale dieses Behandlungsverfahrens wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

10

Die Verabreichung des Wirkstoffs kann auf verschiedene Weise erfolgen, beispielsweise oral, intravenös, topisch oder per Inhalation. Entsprechende Formulierungen sind dem Fachmann geläufig. Die Verabreichungsform hängt vor allem von der zu behandelnden Krankheit sowie natürlich auch von der Konstitution des Patienten ab. Näheres hierzu erschließt sich dem Fachmann.

15

Schließlich umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Suche von Wirkstoffen zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Prostatakrebs, wobei bei diesem Verfahren mindestens ein Protein verwendet wird, welches aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente, Fettsäure-bindendes Protein 3, Galektin, Mikrosemipoprotein beta, Hitzeschockprotein 27, 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Hitzeschockprotein 90, Protein-Disulfid-Isomerase, epidermales Fettsäure-bindendes Protein, mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydrotase, Nucleophosmin, Annexin, insbesondere Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase, Aldolase A, HES1, Proteasomen alpha 2-Untereinheit, Adenin-Phosphoribosyltransferase und anorganische Pyrophosphatase. Besonders bevorzugt sind hierbei Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), nukleäres Chloridionenkanal-

25

30

Protein, 14-3-3 Protein tau, mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder Annexin A3. Weiterhin können auch Abkömmlinge bzw. Derivate dieser Proteine eingesetzt werden, wobei es sich hierbei insbesondere um homologe Sequenzen oder mutierte Formen dieser Proteine handeln kann, die beispielsweise durch molekularbiologische Methoden hergestellt sein können. Weiterhin können als Abkömmlinge Teile dieser Proteine bzw. Subregionen oder Kombinationen der verschiedenen Proteine und/oder Abkömmlinge eingesetzt werden. Die Durchführung des Verfahrens erschließt sich ohne weiteres dem Fachmann, beispielsweise kann ein entsprechendes Protein oder ein Abkömmling davon in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert werden und mit Hilfe dieses Systems die Wechselwirkung mit potentiellen Bindungspartnern, insbesondere Hemmstoffen oder Aktivatoren, untersucht werden. Zur Untersuchung von derartigen Wechselwirkungen eignet sich beispielsweise das Two-Hybrid-System.

Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung erschließen sich aus der folgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder in Kombination miteinander verwirklicht sein.

25

### Beispiele

Zur Identifizierung von erfindungsgemäß relevanten Proteinen wurden die Gewebeproben von zwei Patientengruppen (Gruppe A: 23 Patienten und Gruppe B: 33 Patienten) untersucht. Krebsgewebe und Kontrollgewebe wurde jeweils aufbereitet und einer zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) unterzogen. Die isoelektrische Fo-

kussierung erfolgte bei pH 4-7 und pH 6-11. Die gelelektrophoretischen Ergebnisse von zwei Patienten aus der Gruppe A waren für eine weitere Analyse ungeeignet. Bei weiteren zwei Patienten ergaben die Ergebnisse bei pH 6-11 unbefriedigende Resultate. Insgesamt konnten also die  
5 Ergebnisse von 21 Patienten im pH-Bereich von 4-7 und die Ergebnisse von 19 Patienten im pH-Bereich von 6-11 ausgewertet werden. Aus der Gruppe B waren die Ergebnisse von 2 Patienten bei pH 4-7 für eine weitere Analyse ungeeignet. Insgesamt konnten daher die Ergebnisse von 31 Patienten im pH-Bereich von 4-7 ausgewertet werden.

10

Die beiden verschiedenen Proben jedes Patienten wurden mit jeweils unterschiedlichen Isotopen markiert, gemischt und auf einem einzigen zweidimensionalen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Signale jedes Isotops wurden anschließend getrennt voneinander detek-  
15 tiert, so daß die Proteinmuster der beiden Gewebeproben unmittelbar miteinander verglichen werden konnten (Proteo-Tope-Technologie).

Zur letztendlichen Identifizierung der Proteine wurden analytische Mengen ( $< 1 \mu\text{g}$ ) der radiomarkierten Proteine mit präparativen Mengen ( $> 200 \mu\text{g}$ ) der Proteine der selben Probe zusammen in präparativen Anreicherungs-  
20 gellen aufgetrennt. Die interessanten Proteinspots wurden aus silbergefärbten präparativen Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und durch *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) identifiziert (Bruker BiFlex oder Ultra-  
25 Flex). Teilweise wurde eine *electrospray ionization ion trap mass spectrometry* (ESI-MS) durchgeführt (Bruker Esquire).

Auf diese Weise wurden verschiedene Proteine eindeutig identifiziert, die in übereinstimmender Weise eine erhöhte oder eine erniedrigte  
30 Abundanz in Krebsgewebe im Vergleich mit Kontrollgewebe aufwiesen.

Bei den Analysen wurden zum Teil bestimmte Patientengruppen gebildet, innerhalb derer die Abundanzen der verschiedenen Proteine untersucht wurden. Bei dieser sogenannten Cluster-Analyse (Clustan Graphics 6.4) wurden drei Gruppen von Patienten aus Gruppe A und zwei  
5 Gruppen von Patienten aus Gruppe B bestimmt, die jeweils charakteristische Proteinexpressions-/Abundanzmuster zeigten. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise wurden die Proteine Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A identifiziert, die für bestimmte Patientengruppen charakteristische Abundanzen zeigten.

10

### Gewebeproben

Gesundes Prostatagewebe und malignes Prostatagewebe wurde von  
15 Patienten, die zuvor einer Prostatektomie unterzogen worden waren, erhalten. Die Patienten wurden mit Hilfe des PSA- (prostate specific antigen) Screening untersucht, und die Tumore wurden mit Ultraschall bestätigt. Eine Einwilligung jedes Patienten wurde vor Durchführung der Operation eingeholt.

20

Sofort nach Entnahme der Prostata wurde diese in eine sterile Box überführt und dort gekühlt. Es wurden 0,5 - 1 cm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt wurden. Diese wurden in eine *freezing matrix* eingebettet und schockgefroren. Der Rest  
25 der Prostata wurde in Formalin fixiert und gemäß üblichen Standardverfahren weiterbehandelt. Zur Herstellung von Gewebeproben wurden dünne Sektionen von beiden Seiten der Prostata entnommen und mit Hämatoxilin-Eosin angefärbt. Diese Schnitte wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Kontrollgewebeproben wurden aus nicht-  
30 tumorbefallenen Regionen entnommen und einer identischen Behandlung unterzogen.

### Probenaufbereitung

Die Proteine wurden in 100  $\mu$ l kochendem 2 % SDS, 0,1 M Tris, pH 8,8  
5 lysiert und die Proteinkonzentration anhand der *Bicinchoninic acid*-  
Methode (BCA) bestimmt.

Die Iodierung mit  $^{125}\text{I}$  bzw.  $^{131}\text{I}$ , die zweidimensionale Polyacrylamid-  
Gelelektrophorese sowie die Datenanalyse wurde nach herkömmlichen  
10 Verfahren durchgeführt (Cahill et al., 2003, Rapid Communications in  
Mass Spectrometry 17: 1283-1290). Radioaktives Iod stammte von  
Amersham Bioscience (Freiburg). Die Proteiniodierungsreaktionen ent-  
weder mit  $^{125}\text{I}$  oder  $^{131}\text{I}$  wurden jeweils separat mit identischen Iodkon-  
zentrationen durchgeführt.

15

### Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für den Auftrag auf die Polyacrylamidgele wurden identische Protein-  
20 mengen der markierten Proben (Krebsgewebe und Kontrollgewebe) mit-  
einander gemischt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) über die  
pH-Bereiche 4-7 und 6-11 wurden die Proben in einem üblichen Pro-  
benpuffer auf 18 cm immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Streifen (A-  
mersham Bioscience) geladen. IEF als erste Dimension der 2D-PAGE-  
25 Proteinauftrennung wurde auf einer Multiphor-Apparatur (Amersham Bi-  
oscience) durchgeführt. Die zweite Dimension (SDS-PAGE) wurde auf  
einer ISO-DALT-Apparatur (Höfer) durchgeführt. Die Gele wurden ge-  
trocknet, auf einen 80  $\mu$ m Plastikfilm laminiert, und anschließend wurde  
die radioaktive Messung der Signale von beiden Radioisotopen vorge-  
30 nommen.



Durch die gewählte Analyse der verschiedenen Radioisotope konnte eine quantitative, mehrfarbige differentielle Darstellung der Proteine der verschiedenen Proben erreicht werden. Daher konnte ein direkter Vergleich der integrierten Proteinspotintensitäten der beiden Proben, die auf einem Gel aufgetrennt waren, für die weitere Analyse verwendet werden. Die Analyse auf einem Gel hat den Vorteil, daß Variationen zwischen zwei oder mehr Gelen nicht ins Gewicht fallen. Die größte potentielle Fehlerquelle ist eine unterschiedliche stöchiometrische Markierung mit dem einen oder dem anderen Isotop. Dies wurde durch die Herstellung von Gelen mit jeweils umgekehrten Markierungen ausgeschlossen. Das heißt also, daß die Kontrollprobe und die Krebsgewebeprobe jeweils mit dem einen und auch mit dem anderen Isotop markiert wurden und jeweils invers miteinander verglichen wurden. Da die Proteinmuster der jeweils inversen Markierungsprozeduren übereinstimmten, waren die qualitativen Kriterien erfüllt. Mit Hilfe von computergestützten Vorgehensweisen wurden die verschiedenen Isotopsignale jeweils in einer anderen Farbe (blau bzw. orange) sichtbar gemacht, so daß konsistente Unterschiede in der Abundanz zwischen den Proben jeweils in der einen bzw. anderen Farbe je nach gewählter Isotopenmarkierung erschien. Näheres zu dieser Vorgehensweise ergibt sich aus Cahill et al., 2003, Rapid Communications in Mass Spectrometry 17: 1283-1290.

## 25 Bildanalyse

Die differentielle Proteinabundanzanalyse basiert auf der zuverlässigen differentiellen Quantifizierung der Proteinspots auf den beschriebenen Polyacrylamidgelen. Für eine quantitative Bildanalyse wurde die Phoretix 2D Advanced software (Nonlinear Dynamics) angewendet, wobei eigene Anpassungen vorgenommen wurden.

### Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

Es wurden im Prinzip zwei massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Zum einen die sehr schnelle und zuverlässige Identifizierung von hoch abundanten Proteinen durch *peptide mass fingerprinting* mit MALDI-TOF MS. Die Identifizierung von sehr niedrig abundanten Proteinen wurde mit der zeitaufwendigeren LC-ESI-IonTrap-MS/MS oder MALDI-TOF-TOF Methode durchgeführt. Zusammengefaßt wurden Gelstücke der ausgewählten Proteinspots ausgeschnitten und die Proteine in diesen Gelstücken mit Hilfe von Trypsin verdaut. Die resultierende Lösung wurde zunächst mit der *peptide mass fingerprint*-Prozedur basierend auf MALDI-TOF-MS analysiert. Für die Proteinspots, für die auf diese Weise keine eindeutige Identifikation möglich war, wurde die langsamere Fragmentationenanalyse, basierend auf MALDI-TOF-TOF oder LC-ESI-IonTrap-MS/MS zusätzlich durchgeführt. Eine genaue Beschreibung dieser Methoden ist Vogt et al., 2003, Rapid Communication in Mass Spectrometry 17: 1273-1282 und Vogt et al., 2003, Molecular Cellular Proteomics 2: 795 zu entnehmen.

20

### Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der Proteine wurden die Peptidmassen, die durch die Massenspektrometrie gewonnen wurden, gegenüber der NCBI-Proteindatenbank ausgewertet. Dies wurde mit Hilfe des Programms MASCOT Version 1.9 (Matrix Science, London, UK) durchgeführt.

30

### Quantitative Bildanalyse

Quantitative Analysen wurden mit Hilfe der digitalen Daten durchgeführt, die mit einem Photomultiplier eines Radio-Imagers für jeden Pixel der Bildmatrix aufgezeichnet wurden. Die Proteinspotgrenzen wurden mit Hilfe der Software Phoretix 2D Advanced (Nonlinear Dynamics) definiert und die Pixelwerte innerhalb der Spotregion nach Subtraktion eines geeigneten Hintergrundsignals integriert. Basierend auf den kompletten Daten, die generiert wurden, wurde eine detaillierte Quantifizierung der detektierten Proteinspots durchgeführt. Die Tabelle 1 enthält eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse.

Die Figuren 1 und 2 zeigen jeweils die Positionen der ausgewählten Proteinspots, einmal bei isoelektrischer Fokussierung bei pH 4-7 (Fig. 1) und im anderen Fall bei pH 6-11 (Fig. 2).

In den Abbildungen zeigen:

Fig. 1: Darstellung eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels mit aufgetrennten Proteinen eines Patienten aus der Gruppe A. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei pH 4-7. Die mit Zahlen markierten Proteinspots zeigen diejenigen Proteine, die abweichende Abundanz in Krebsgewebe und Kontrollgewebe zeigen. Die Numerierung entspricht der Tabelle 1.

Fig. 2: Darstellung eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels mit aufgetrennten Proteinen eines Patienten aus der Gruppe A. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei pH 6-11. Die mit Zahlen markierten Proteinspots zeigen diejenigen Proteine, die abweichende Abundanz in Krebsgewebe und Kontrollgewebe zeigen. Die Numerierung entspricht der Tabelle 1.

- Fig. 3: Graphische Darstellung der Proteinmuster, die für bestimmte Patientengruppen bzw. Unterarten von Prostatakrebs charakteristisch sind. Ergebnisse mit T-Testwahrscheinlichkeiten von  $p < 0,01$  sind schwarz dargestellt, Ergebnisse mit T-Testwahrscheinlichkeiten von  $0,01 < p < 0,1$  sind grau dargestellt. Proteine, die in ihrer Abundanz innerhalb der verschiedenen Cluster variieren, sind eingerahmt.
- Fig. 4: Tabellarische Darstellung der verschiedenen Proteinlevel der Patientengruppen 1 bis 3 aus der Gruppe A im Vergleich von gutartigem (gesundem) und bösartig entartetem Gewebe. Die Angaben beziehen sich auf Prozent der Proteinspotgröße von Krebsgewebe mit Standardfehler im Verhältnis zum gesamten Proteinspotvolumen (gutartig + bösartig). Das T-Testergebnis ist als die Wahrscheinlichkeit dargestellt, daß die Verteilung der Spotfraktionen aus zwei gegebenen Gruppen signifikant unterschiedlich ist. T-Testergebnisse von wenigstens 99 % sind fettgedruckt. Ergebnisse von unterhalb 95 % sind hellgrau dargestellt.
- Fig. 5: Tabellarische Liste der Proteinspots mit signifikanter differentieller Abundanz der Patienten aus der Gruppe A im Vergleich von gutartigem (gesundem) und bösartigem Gewebe, basierend auf der Zweifarben-ProteoTope-Analyse. „No. Obs.“ gibt die Anzahl der Patienten wieder, bei welchen der Spot beobachtet werden konnte. Die Spotfraktion für gutartiges (benigne Faktion) und bösartiges (Krebs-Fraktion) mit Standardfehler ist in Prozent des gesamten Spotvolumens (gutartig + bösartig) angegeben. Das T-Testergebnis ist als Wahrscheinlichkeit angegeben, daß die Verteilung der Spotfraktionen für gutartiges Gewebe von der Verteilung, die in Krebsgewebe gefunden wurde, abweicht, wobei alle Patienten

ten berücksichtigt wurden. Die Spots wurden unter der Voraussetzung ausgewählt, daß die T-Testwahrscheinlichkeit wenigstens 99 % beträgt.

- 5    Fig. 6:        Darstellung eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels mit aufgetrennten Proteine des Patienten 14 aus der Gruppe B. Sowohl die Kontrollprobe als auch die Krebsgewebeprobe werden mit  $^{131}\text{I}$  und  $^{125}\text{I}$  markiert und invers miteinander verglichen. Die verschiedenen Isotopsignale sind jeweils in einer anderen Farbe (Blau bzw. Orange) sichtbar gemacht, so daß konsistente Unterschiede in der Abundanz von Proteinen zwischen den Proben jeweils in der einen bzw. anderen Farbe, je nach gewählte Isotopenmarkierung, erscheinen.
- 10
- 15   Fig. 7:        Graphische Darstellungen, die die Genauigkeit und die statistische Bedeutung der Proteo-Tope Messungen am Beispiel der Gruppe B zeigen:
- 20                   a: Bland und Altman Plot, der das Verhältnis zwischen dem Unterschied in dem differentiellen Abundanzverhältnis M und ihrem arithmetischen Mittel für ein mit  $^{125}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  markiertes Gel wiedergibt,
- 25                   b: Plot, der das Verhältnis zwischen dem Unterschied in dem differentiellen Abundanzverhältnis M und dem arithmetischen Mittel der Intensität A für ein mit  $^{125}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  markiertes Gel wiedergibt,
- 30                   c: MA-Plot, der das Verhältnis zwischen dem differentiellen Abundanzverhältnis M und der Intensität A für ein mit  $^{125}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  markiertes Gel,

wobei  $M = \log_2 \cdot (I_2/I_1)$  und  $A = 0,5 \cdot \log_2 \cdot (I_1 \cdot I_2)$  ist ( $I$  = gemessene Intensität).

5 Fig. 8: Volcano Plot, der den Unterschied zwischen den Durchschnittsintensitäten der nachgewiesenen invers markierten Proteine aus karzinomatösem und gutartigen Gewebe zeigt.

10 Fig. 9: Grafische Darstellung der Pavlidis Templat Matching Analyse, die unter den Krebspatienten aus Gruppe B zwei Untergruppen von Proteinabundanzverhältnismustern ergibt. Eine Gruppe besteht aus 22 Patienten, die andere Gruppe, die sich wesentlich davon unterscheidet, aus 9 Patienten. Die Proteinnummern entsprechen den Nummern in der Tabelle von Fig. 10. Innerhalb der Untergruppe aus 22 Patienten unterscheidet sich die relative Abundanz von Annexin A3 (Protein 14) deutlich. Das Protein ist bei den Patienten 14, 11, 10, 21, 3, 1, 6, 22, 23, 7, 4, 19 und 27 deutlich abundanter in malignem Prostatagewebe als bei den Patienten 29, 28, 32, 15, 31, 24, 25, 30 und 33.

20 Fig. 10: Tabellarische Darstellung der Proteinspots aus der differenzellen Analyse von allen 31 Patienten (Gruppe B), der Gruppe mit 22 und der Gruppe mit 9 Patienten (erhalten durch die Pavlidis Templat Matching Analyse). Die *Accession Number* entspricht der jeweiligen Nummer aus der NCBI-Datenbank. Unter „scores“ sind die mit Hilfe der MASCOT-Technik ermittelten Treffer zu verstehen. Die Angabe zum PMF-Score bezieht sich auf den Mowse-Score, der vom MASCOT-Server verwendet wird, wobei im allgemeinen ein PMF-Score, der höher als 65 ist, eine signifikante Identifizierung repräsentiert. Die Identität der mit einem Sternchen versehenen Proteine wurde durch LC/MS/MS be-

25

30

5

stimmt. Die durchschnittliche Spotfraktion von karzinomatösem Gewebe ist mit Standardfehler in Prozent des gesamten Spotvolumens (gutartig + bösartig) angegeben. Der P-Wert für dieses Model ist ebenfalls angegeben. Die Balken in der tabellarische Darstellung zeigen die durchschnittliche Abundanz in % eines jeden Proteins in den benignen (dunkel Blau) und karzinomatösen (leicht Orange) Proben in den aufgeführten Patientengruppen.

10

### Patentansprüche

1. Verwendung des Proteins Annexin A3 als diagnostischer Marker für Prostatakrebs.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um bestimmte Unterarten von Prostatakrebs handelt.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation des Annexin A3 im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation von Annexin A3 in Kombination mit einer Herabregulation von Annexin A1, Annexin A2 und/oder Annexin A5 untersucht wird.
5. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der mit dem Protein Annexin A3 wechselwirkt, insbesondere die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins Annexin A3 beeinflusst, vorzugsweise hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs, vorzugsweise von bestimmten Patientengruppen von Prostatakrebs.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Agonist, Antagonist, eine *deficient*-Mutante, eine *dominant-negative*-Mutante und/ oder ein *antisense*-Molekül ist.



7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antikörper, vorzugsweise ein therapeutischer Antikörper, ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mindestens ein Benzodiazepin-Derivat, insbesondere BDA250 und/oder BDA452, ist.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins Annexin A3 in Exosomen beeinflußt wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht (MG) <1000 zur Inhibierung der Ionenkanalaktivität in Membranen, vorzugsweise der Exosomen und/oder Matrixvesikel, ist.
11. Verwendung des Proteins mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase als diagnostischer Marker für Krebs.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
13. Verwendung des Proteins Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als diagnostischer Marker für Krebs.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Herabregulation der Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder eine

Heraufregulation der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.

15. Verwendung des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) als diagnostischer Marker für Krebs.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Herabregulation der Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
17. Verwendung des Proteins nukleäres Chloridionenkanal-Protein als diagnostischer Marker für Prostatakrebs.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation des nukleären Chloridionenkanal-Proteins im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
19. Verwendung des Proteins HES1 als diagnostischer Marker für Krebs.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation von HES1 im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
21. Verwendung der Proteasomen alpha 2-Untereinheit als diagnostischer Marker für Krebs.
22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation der Proteasomen alpha 2-Untereinheit im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.

23. Verwendung des Proteins Adenin-Phosphoribosyltransferase als diagnostischer Marker für Prostatakrebs.
24. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation der Adenin-Phosphoribosyltransferase im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
25. Verwendung des Proteins anorganische Pyrophosphatase als diagnostischer Marker für Prostatakrebs.
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Heraufregulation der anorganischen Pyrophosphatase im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
27. Verwendung der Proteine Ubiquitin-Isopeptidase T und Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) als diagnostische Marker für Krebs, wobei vorzugsweise eine Herabregulation der Proteine im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
28. Verwendung von mindestens zwei Proteinen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-Isopeptidase T, Hitzeschockprotein 27 (HSP27), Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und Nucleophosmin als diagnostischer Marker für Krebs, wobei eine Herabregulation von Ubiquitin-Isopeptidase T und/oder Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und/oder eine Heraufregulation von Hitzeschockprotein 90 (HSP90), Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und/oder Nucleophosmin im Vergleich mit Kontrollen untersucht wird.
29. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Krebs Prostatakrebs ist.

30. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Untersuchung eines oder mehrerer Proteine Unterarten von Krebs, insbesondere von Prostatakrebs, diagnostiziert werden.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Protein gemäß Anspruch 28 in Kombination mit mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serum-Amyloid P Komponente (SAP), Fettsäurebindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, epidermales Fettsäurebindendes Protein (E-FABP), Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A, untersucht werden, wobei keine oder kleine Veränderungen von SAP, eine Herabregulation von FABP-3, eine starke Herabregulation von Galektin, eine starke Herabregulation von Mikrosemipoprotein beta, keine oder kleine Veränderungen von 14-3-3 Protein beta, keine oder kleine Veränderungen von 14-3-3 Protein zeta, keine oder kleine Veränderungen von nukleärem Chloridionenkanal-Protein, keine oder kleine Veränderungen von 14-3-3 Protein tau, keine oder kleine Veränderungen von E-FABP, keine oder kleine Veränderungen von Annexin A3, eine Heraufregulation von Transgelin, keine oder kleine Veränderungen von Triosephosphat-Isomerase und/oder keine oder kleine Veränderungen von Aldolase A im Vergleich mit Kontrollen untersucht werden.
32. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Protein gemäß Anspruch 28 in Kombination mit mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serum-Amyloid P Komponente (SAP), Fettsäure-

bindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A, untersucht werden, wobei eine starke Heraufregulation von PDI, eine starke Heraufregulation von HSP90, eine starke Herabregulation von Ubiquitin-Isopeptidase T, eine Herabregulation von SAP, keine oder kleine Veränderungen von FABP-3, eine Herabregulation von Galektin, eine Herabregulation von Mikrosemipoprotein beta, eine Heraufregulation von 14-3-3 Protein beta, eine Heraufregulation von 14-3-3 Protein zeta, eine Heraufregulation von 14-3-3 Protein tau, keine oder kleine Veränderungen von nukleärem Chloridionenkanal-Protein, eine Heraufregulation von Annexin A3, eine Herabregulation von Transgelin, eine Heraufregulation von Triosephosphat-Isomerase und/oder eine Heraufregulation von Aldolase A im Vergleich mit Kontrollen untersucht werden.

33. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Protein gemäß Anspruch 28 in Kombination mit mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serum-Amyloid P Komponente (SAP), Fettsäurebindendes Protein 3 (FABP-3), Galektin, Mikrosemipoprotein beta, 14-3-3 Protein beta, 14-3-3 Protein zeta, nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, epidermales Fettsäurebindendes Protein (E-FABP), Annexin A3, Transgelin, Triosephosphat-Isomerase und Aldolase A, untersucht werden, wobei eine Herabregulation von SAP, keine oder kleine Veränderungen von FABP-3, keine oder kleine Veränderungen von Galektin, keine oder kleine Veränderungen von Mikrosemipoprotein beta, keine oder kleine Veränderungen von 14-3-3 Protein beta, keine oder kleine Veränderungen von 14-3-3 Protein zeta, eine starke Heraufregulation von nukleärem Chloridionenkanal-Protein, keine oder kleine

Veränderungen von 14-3-3 Protein tau, keine oder kleine Veränderungen von E-FABP, keine oder kleine Veränderungen von Annexin A3, keine oder kleine Veränderungen von Transgelin, keine oder kleine Veränderungen von Triosephosphat-Isomerase und/oder keine oder kleine Veränderungen von Aldolase A im Vergleich mit Kontrollen untersucht werden.

34. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Protein mit Hilfe von Polyacrylamid-Gelelektrophorese, insbesondere zweidimensionaler Gelelektrophorese, Massenspektrometrie, Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Antikörpern, ELISA, Immunohistochemie, ProteinChips und/oder Oligonukleotiden, insbesondere Polymerasekettenreaktion (PCR), nachgewiesen wird.
35. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für eine Untersuchung des mindestens einen Proteins Exosomen isoliert und/oder analysiert werden.
36. Diagnosekit, umfassend mindestens eine Substanz zum Nachweis der Aktivität und/oder Abundanz von mindestens einem Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), nukleäres Chloridionenkanal-Protein, mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase und Annexin A3 zur Erkennung von Krebserkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs.
37. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz der Proteine Ubiquitin-Isopeptidase T und Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, wobei vorzugsweise der Wirkstoff die Aktivität und/oder Abundanz der Ubiquitin-Isopepti-

dase T steigert und/oder der Wirkstoff die Aktivität und/oder Abundanz der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) hemmt.

38. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydratase beeinflusst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
39. Verwendung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Aktivität und/oder Abundanz der mitochondrialen Enoyl-Coenzym A-Hydratase hemmt.
40. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität, Abundanz und/oder Lokalisation des Proteins Serum-Amyloid P-Komponente (SAP) beeinflusst, insbesondere steigert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
41. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins nukleäres Chloridionenkanal-Protein beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.
42. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins HES1 beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.
43. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz der Proteasomen alpha 2-Untereinheit beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

44. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins Adenin-Phosphoribosyltransferase beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.
45. Verwendung von mindestens einem Wirkstoff, der die Aktivität und/oder Abundanz des Proteins anorganische Pyrophosphatase beeinflusst, insbesondere hemmt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs.
46. Verwendung nach einem der Ansprüche 37 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Krebs um Prostatakrebs, vorzugsweise um bestimmte Unterarten von Prostatakrebs, handelt.
47. Verwendung nach einem der Ansprüche 37 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Agonist, Antagonist, eine *deficient*-Mutante, eine *dominant-negative*-Mutante und/ oder ein *anti-sense*-Molekül ist.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 37 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein Antikörper, vorzugsweise ein therapeutischer Antikörper, ist.
49. Verwendung nach einem der Ansprüche 37 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht (MG) <1000 zur Inhibierung der Ionenkanalaktivität in Membranen, vorzugsweise der Exosomen und/oder Matrixvesikel, ist.
50. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mindestens ein Protein ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe Ubiquitin-Isopeptidase T,



Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), Fettsäure-bindendes Protein 3 (FABP-3), Annexin A3, Galektin, Mikroseminalprotein beta, Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Transgelin.

51. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Form von Exosomen bereitgestellt wird.
52. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens einen Wirkstoff gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche sowie mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
53. Verfahren zur Suche von Wirkstoffen zur Behandlung von Krebs, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ubiquitin-Isopeptidase T, Serum-Amyloid P-Komponente (SAP), nukleäres Chloridionenkanal-Protein, 14-3-3 Protein tau, mitochondriale Enoyl-Coenzym A-Hydrolase, Annexin A3, HES1, Proteasomen alpha 2-Untereinheit, Adenin-Phosphoribosyltransferase und anorganische Pyrophosphatase und/oder mindestens ein Abkömmling davon, verwendet wird.

-----

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**(01/00) THIS PAGE BLANK (USPTO)**

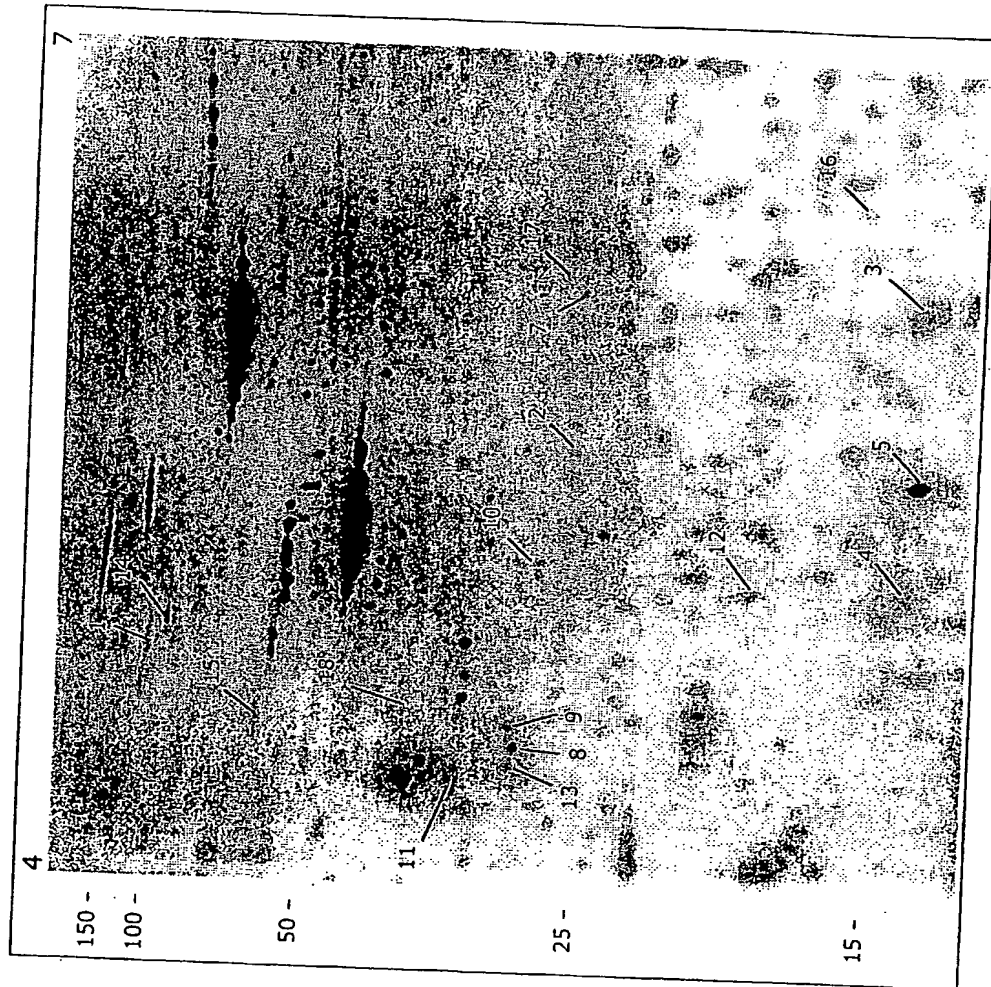


Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

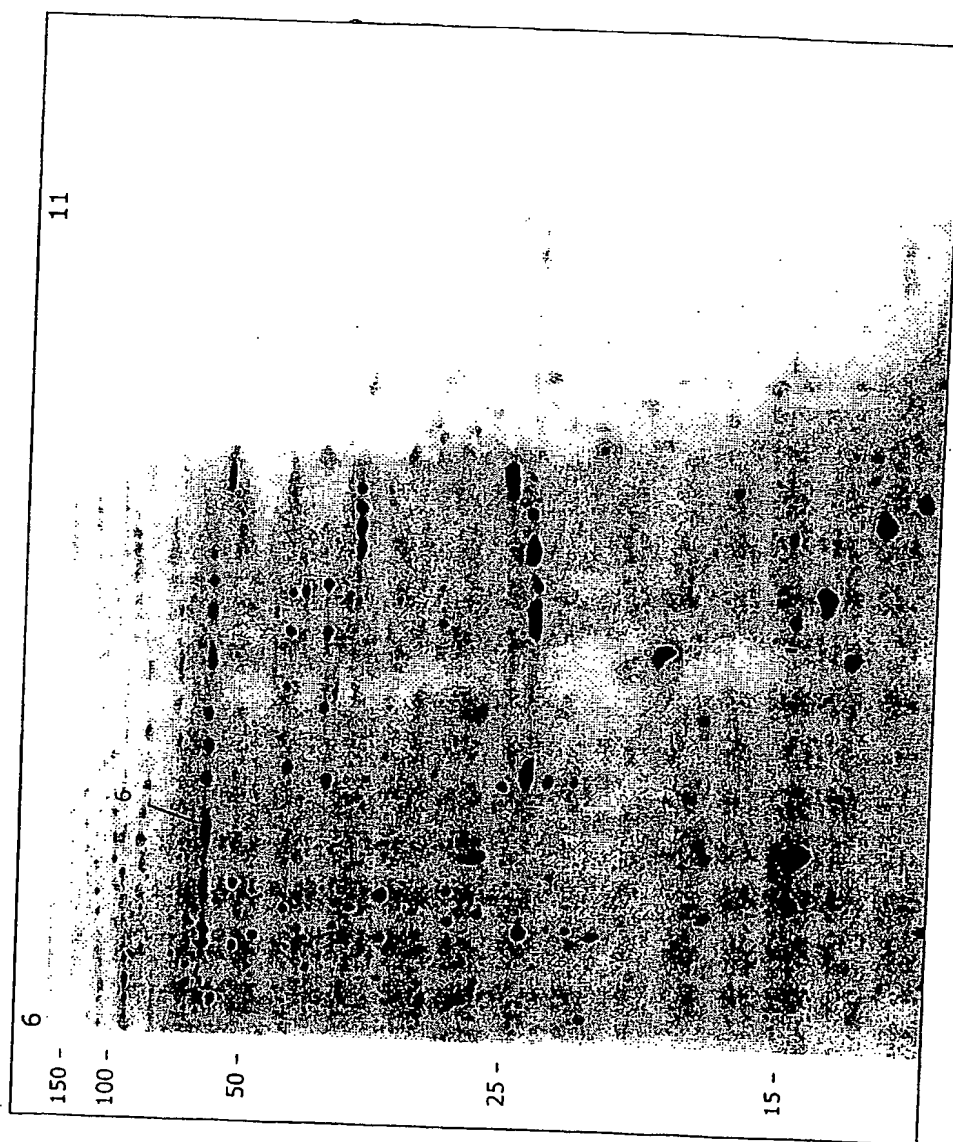


Fig. 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

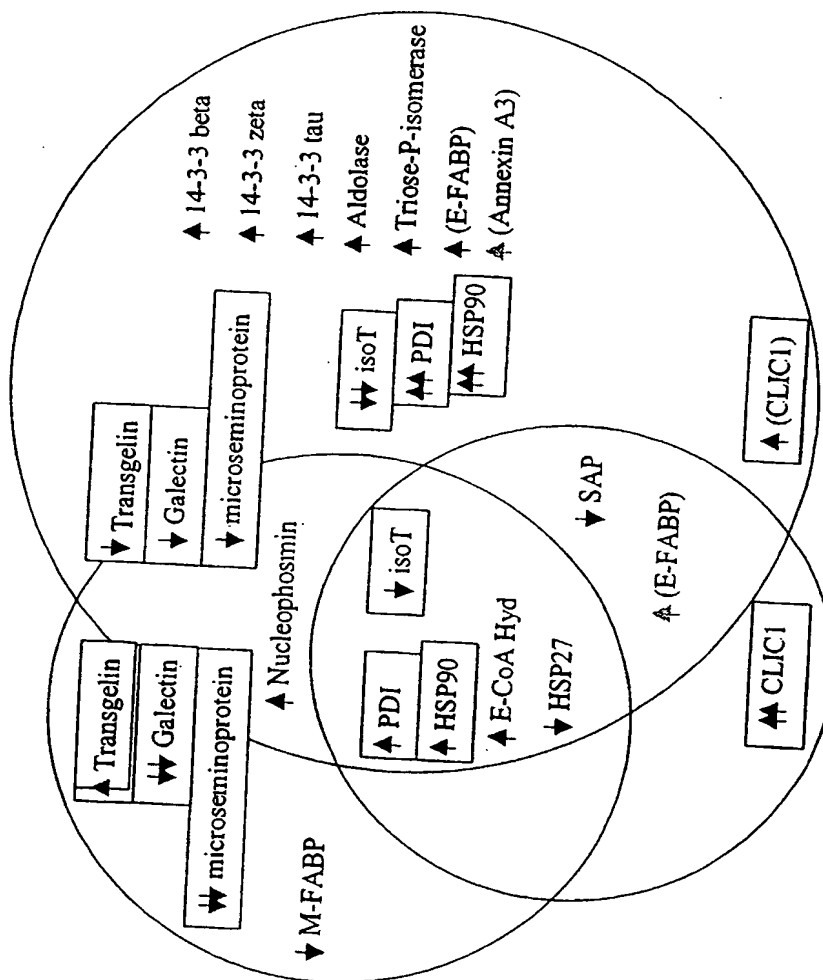


Fig. 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



	Krebs Cluster 1	Krebs Cluster 2	Krebs Cluster 3	T-Test C1 / C2	T-Test C2 / C3	T-Test C1 / C3	0	50	100
1 Lectin, galactose-binding	4.4 ± 2.5	32.2 ± 8.1	58.8 ± 6.5	97.81	96.16	99.97			
2 M-FABP	7.6 ± 4.0	35.7 ± 12.7	44.4 ± 4.3	91.99	49.62	99.55			
3 microsemihoprotein	16.6 ± 3.5	36.6 ± 2.9	51.5 ± 4.5	99.90	98.23	99.95			
4 n.i.	23.1 ± 1.5	41.8 ± 8.3	53.6 ± 6.5	78.96	58.11	95.46			
5 isopeptidase T	25.6 ± 2.2	2.2 ± 1.6	22.4 ± 6.6	99.99	94.72	31.40			
6 Serum Amyloid P Component	56.2 ± 2.5	15.4 ± 6.2	22.4 ± 6.5	99.85	53.14	99.63			
7 Transgelin	62.4 ± 7.4	27.8 ± 9.7	44.7 ± 8.4	97.76	73.12	82.74			
8 n.i.	37.5 ± 9.4	34.5 ± 4.9	51.3 ± 9.4	23.88	83.99	58.11			
9 n.i.	45.3 ± 7.6	38.1 ± 1.7	49.5 ± 8.8	72.84	83.07	25.93			
10 nuclear chloride ion channel	48.4 ± 2.5	60.1 ± 4.9	74.5 ± 7.1	90.84	86.75	98.73			
11 n.i.	50.4 ± 4.1	62.3 ± 4.4	41.3 ± 9.5	88.55	93.41	48.63			
12 triosephosphate isomerase	50.3 ± 2.0	62.8 ± 4.6	48.7 ± 3.5	93.46	95.59	26.32			
13 biliverdin reductase B	53.2 ± 6.9	63.3 ± 4.3	49.0 ± 8.0	75.56	79.52	27.12			
14 n.i.	42.6 ± 11.0	63.7 ± 3.6	52.7 ± 3.4	94.89	91.91	57.87			
15 aldolase A [Homo sapiens]	47.4 ± 3.1	66.2 ± 5.0	41.2 ± 8.0	98.14	97.96	45.28			
16 n.i.	53.6 ± 3.5	66.7 ± 4.0	56.9 ± 3.4	94.99	88.75	45.06			
17 aldolase A [Homo sapiens]	49.0 ± 9.1	66.9 ± 3.7	49.4 ± 3.5	94.15	98.92	3.40			
18 14-3-3 beta	49.2 ± 2.0	67.1 ± 3.8	56.1 ± 3.5	99.68	92.46	83.90			
19 n.i.	49.0 ± 2.4	67.6 ± 6.6	44.7 ± 4.1	96.33	97.53	54.05			
20 n.i.	46.1 ± 4.5	67.8 ± 5.4	48.7 ± 3.2	98.20	98.16	34.24			
21 14-3-3 zeta	52.7 ± 2.6	67.9 ± 3.6	50.5 ± 2.1	98.61	99.68	47.20			
22 n.i.	36.9 ± 8.0	73.1 ± 3.8	48.9 ± 10.8	99.84	97.07	55.60			
23 n.i.	50.1 ± 5.2	76.9 ± 4.3	56.6 ± 2.1	99.70	99.28	66.31			
24 14-3-3 tau	54.9 ± 4.3	77.8 ± 3.9	55.2 ± 2.8	99.71	99.89	4.08			
25 heat shock protein 90	56.0 ± 9.1	82.0 ± 5.7	62.1 ± 1.5	95.78	95.59	36.32			
26 annexin A3	56.4 ± 13.0	83.3 ± 4.9	52.1 ± 14.4	89.38	88.03	14.65			
27 prollyl 4-hydroxylase beta s	55.0 ± 6.5	83.9 ± 3.3	60.0 ± 3.0	99.93	99.88	41.95			
28 enoyl-coenzyme A hydratase	68.2 ± 6.4	84.2 ± 3.9	71.4 ± 8.3	95.08	79.35	21.82			
29 E-FABP	57.9 ± 13.0	84.4 ± 9.7	64.2 ± 12.5	84.84	74.74	23.75			
30 Similar to nucleophosmin	87.7 ± 1.8	86.0 ± 7.9	62.1 ± 24.2	11.36	65.71	54.05			
31 heat shock protein 27	39.9 ± 3.1	39.2 ± 6.2	40.6 ± 1.2	6.87	14.28	15.32			

Fig. 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	NO.	NO.	benig	Wras	T-Test	chan	0	50	100
	Pat.	Obs.	Fraktion	Fraktion	StdErr	chan	0	50	100
Isopeptidase T	21	12	83.6	5.2	16.4	5.0	100.0	-5.1	
Serum Amyloid P Component	21	19	73.1	5.8	26.9	5.8	100.0	-2.7	
M-FABP	21	8	71.6	8.3	28.4	8.3	100.0	-2.5	
Lectin; galactose-binding	21	14	66.2	7.1	33.8	7.1	100.0	-2.0	
microseminoprotein	21	20	63.9	4.1	36.1	4.1	100.0	-1.8	
n.i.	19	12	60.6	5.3	39.5	5.3	100.0	-1.5	
heat shock protein 27	21	20	60.2	3.7	39.8	3.7	100.0	-1.5	
14-3-3 beta	21	21	41.2	3.0	58.8	3.0	100.0	1.4	
14-3-3 zeta	21	20	41.1	3.3	58.9	3.3	100.0	1.4	
nuclear chloride ion channel	21	21	40.1	3.8	59.9	3.8	100.0	1.5	
n.i.	21	20	39.5	3.3	60.5	3.3	100.0	1.5	
annexin A3	21	15	35.8	8.2	64.2	7.8	98.5	1.8	
14-3-3 tau	21	20	35.6	3.7	64.4	3.7	100.0	1.8	
heat shock protein 90	21	13	32.6	6.4	67.4	6.4	100.0	2.1	
prolyl 4-hydroxylase beta subunit	21	19	31.2	4.5	68.8	4.4	100.0	2.2	
E-FABP	21	13	27.9	7.7	72.1	7.7	100.0	2.6	
enoyl-coenzyme S hydratase	21	18	26.2	4.6	73.8	4.5	100.0	2.8	
Similar to nucleophosmin	21	12	21.9	9.1	78.1	7.2	100.0	3.6	

Fig. 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

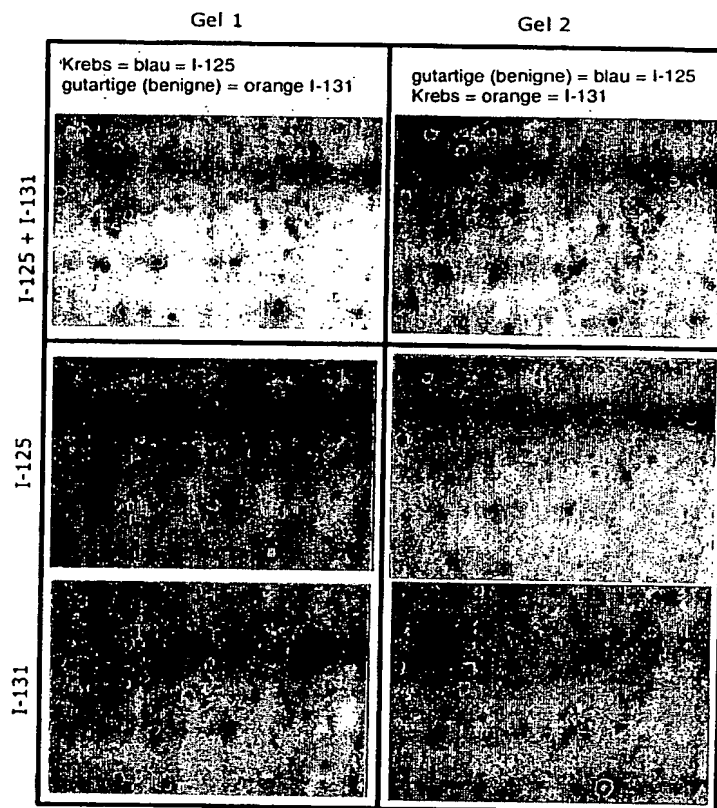


Fig. 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

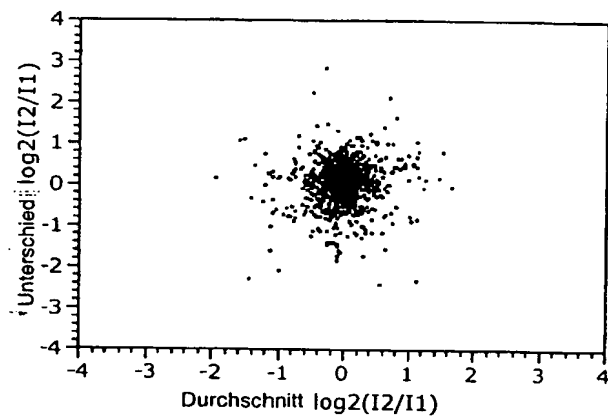


Fig. 7a

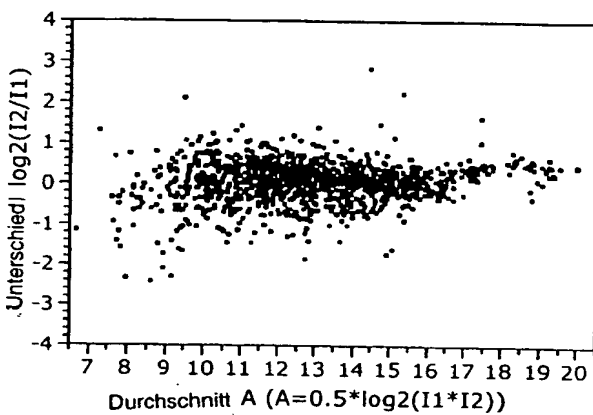


Fig. 7b

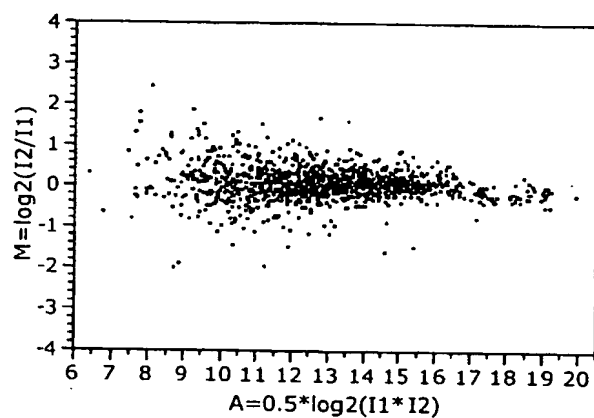


Fig. 7c

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



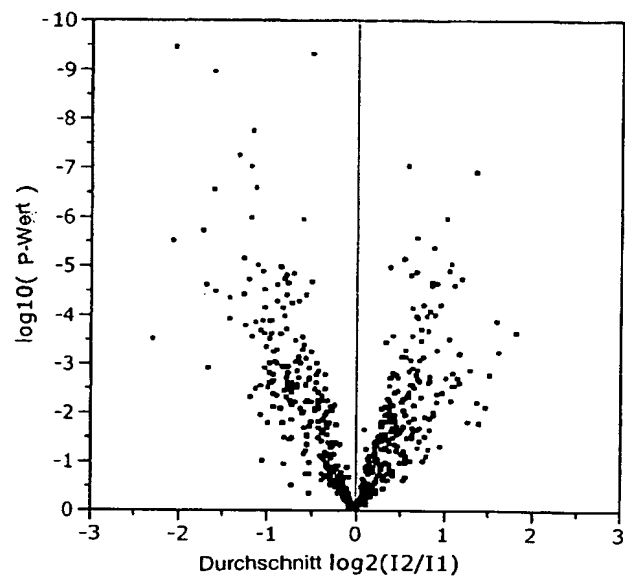


Fig. 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

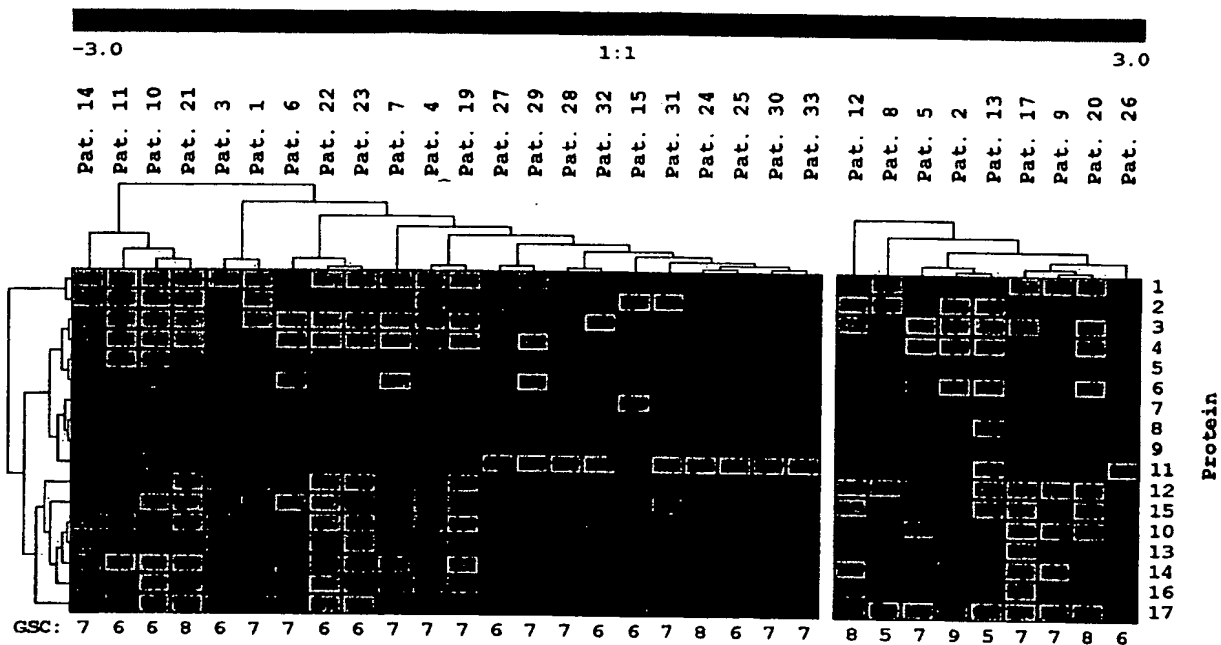


Fig. 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Identifikation				31 Patienten			22/31 Patienten			9/31 Patienten					
Nr.	Protein Name	Accession Nr.	PMF score	P-Wert	0	50	100	P-Wert	0	50	100	P-Wert	0	50	100
1	IsoT	gi 1732411	115	<0.0001				0.0006				0.0300			
2	SAP	gi 576259	106*	0.0001				0.0005				0.1398			
3	M-FABP	gi 494781	87	0.0048				0.0069				0.4640			
4	Galectin-1	gi 4504981	177*	0.0124				0.0106				0.4400			
5	HSP 27	gi 662841	182*	0.0007				0.0071				0.0050			
6	microseminoprotein	gi 225159	92*	0.0002				0.0002				0.1602			
7	Rho GDI	gi 4757768	150	0.0011				0.0005				0.9058			
8	14-3-3 zeta	gi 4507953	160*	0.0009				0.0003				0.6951			
9	14-3-3 beta	gi 4507949	160*	0.0016				0.0008				0.8253			
10	HSP 90, alpha	gi 13129150	147	0.0006				0.0005				0.4506			
	HSP 90, beta	gi 20149594	164												
11	14-3-3 tau	gi 5803227	130*	0.0028				0.0028				0.2661			
12	BiP/HspA5	gi 87528	273	0.1551				0.0075				0.1843			
13	PDI	gi 20070125	235	<0.0001				<0.0001				0.4575			
14	Annexin A3	gi 4826643	160	0.0453				0.0008				0.5030			
15	E-FABP	gi 4557581	94*	0.0009				0.0010				0.4807			
16	Enoyl-co A hydratase	gi 12707570	101*	<0.0001				<0.0001				0.2054			
17	Nucleophosmin	gi 16307090	77	0.0015				0.0001				0.8401			

Fig. 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**